

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



Studium interakcí PI4 kinasy

Study of interactions of PI4 kinase

Bakalářská práce

Andrea Eisenreichová

Školitel: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Mgr. et Mgr. Evžena Bouří, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 22. května 2015

podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. et Mgr. Evžen Bouřovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení, schovívavost a obrovskou dávku trpělivosti. Dále patří velký dík všem členům laboratoře za jejich vstřícnost, ochotu vždy pomoci a poradit a vytvoření přátelského pracovního prostředí. Děkuji také Doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za cenné rady při zpracovávání bakalářské práce.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a všem blízkým za neutuchající podporu při mém studiu.

Abstrakt

14-3-3 proteiny jsou důležitými regulačními bílkovinami, jež se nacházejí ve všech eukaryotních organismech, v lidských buňkách tvoří rodinu 14-3-3 proteinů sedm isoform. Funkce 14-3-3 proteinů spočívá v interakci s jejich vazebnými partnery, jichž zatím bylo identifikováno několik set. Tito partneři mají klíčové role v mnoha buněčných pochodech, jako je signalizace, regulace buněčného cyklu a dělení, apoptosa a další.

Tato bakalářská práce se zabývá studiem interakce 14-3-3 proteinu a fosfatidylinositol 4-kinasy III β (PtdIns4KIII β) na molekulární úrovni metodou rentgenové krystalografie. PtdIns4KIII β nacházející se na cytosolové straně membrán převážně Golgiho aparátu katalyzuje připojení fosfátové skupiny na čtvrtý uhlík inositolového kruhu. Aktivita PtdIns4KIII β je závislá na fosforylaci serinu v pozici 294. Tato fosforylace nejen, že zvyšuje kinasovou aktivitu PtdIns4KIII β , ale také je podmínkou pro vazbu 14-3-3 proteinů. Tato interakce zajišťuje ochranu PtdIns4KIII β před defosforylací a tak zaručuje nepřetržitou syntézu fosfatidylinositol 4-fosfátu, významné signalizační molekuly a prekursoru pro další fosfátové deriváty fosfatidylinositolu.

Abstract

The family of 14-3-3 proteins is one of great regulatory significance, which can be found in all the eucaryotic organisms and consists of seven isoforms in human cells. The function of 14-3-3 proteins rests in the interaction with their ligands, of which several hundreds has been identified. The key role of these partners comes to pass in many cellular processes such as signalization, regulation of a cell cycle and division, apoptosis and others.

This thesis deals with the interaction of 14-3-3 protein with fosfatidylinositol 4-kinase III β on a molecular level using the method of X-ray crystallography. Phosphatidylinositol 4-kinase III β (PtdIns4KIII β) situated on a cytosol side of mostly Golgi apparatus membranes catalyses the connection of a phosphate group to the fourth carbon of an inositol circle. The activity of PtdIns4KIII β depends upon the phosphorylation of Ser294. Not only this phosphorylation increases the kinase activity PtdIns4KIII β , but is the condition of 14-3-3 proteins binding as well. This interaction provides the protection of PtdIns4KIII β against dephosphorylation and this way it guarantees continual synthesis of

phosphatidylinositol 4-phosphate, a major signalization molecule and the precursor of other phosphate derivatives of phosphatidylinositol. (In Czech)

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD.....	10
1.1 Regulace funkce proteinů.....	10
1.1.1 Regulace množství proteinu	10
1.1.2 Regulace aktivity enzymu	12
1.2 14-3-3 proteiny.....	14
1.2.1 Funkce 14-3-3 proteinů a jejich vazební partneři.....	15
1.2.2 Mechanismus regulace 14-3-3 proteiny	15
1.2.3 Sekvence na cílovém proteinu.....	17
1.2.4 Struktura 14-3-3 proteinů	18
1.2.5 14-3-3 protein jako dimer.....	19
1.2.6 Fosforylace 14-3-3 proteinu – regulace funkce.....	20
1.2.7 Vazba ligandu na 14-3-3 proteiny	21
1.3 Fosfatidylinositol 4-kinasa III β	22
1.3.1 Fosfatidylinositol kinasy	22
1.3.2 Výskyt a funkce fosfatidylinositol 4-kinasy III β	22
1.3.3 Struktura fosfatidylinositol 4-kinasy III β	23
1.3.4 Interakce PtdIns4KIII β s 14-3-3 proteinem.....	24
1.4 Rentgenostrukturní analýza.....	25
1.4.1 Difrakce rentgenového záření.....	25
1.4.2 Vytvoření mapy elektronové hustoty, fázový problém a jeho řešení.....	27
1.4.3 Modelování struktury	28
2 CÍLE PRÁCE.....	29
3 PŘÍSTOJE A MATERIÁL	30
3.1 Přístroje a pomůcky.....	30
3.2 Materiál a chemikálie	31
3.2.1 Roztoky, pufrý a média	32
3.2.2 Enzymy	33
3.2.3 Primery	33

3.3	Bakteriální kmeny	33
4	METODY	34
4.1	Příprava vektoru pro bakteriální expresi 14-3-3ζ.....	34
4.1.1	Polymerasová řetězová reakce (PCR)	34
4.1.2	Horizontální agarosová elektroforesa.....	35
4.1.3	Amplifikace vektorové DNA	35
4.1.4	Štěpení plasmidu a produktu PCR restikčními endonukleasami.....	35
4.1.5	Ligace	36
4.1.6	Transformace kompetentních buněk <i>E.coli</i> DH5α	36
4.1.7	PCR z kolonií a následná minipreparace DNA	36
4.1.8	Sekvenace	37
4.2	Expres a purifikace rekombinantního 14-3-3ζ	38
4.2.1	Expres rekombinantního proteinu v buňkách <i>E.coli</i> BL21 star.....	38
4.2.2	Purifikace proteinu	38
4.3	Expres a purifikace 14-3-3 z <i>Lachanea thermotolerans</i>	40
4.4	Rentgenová krystalografie	41
4.4.1	Krystalizace 14-3-3ζ v komplexu s peptidem PtdIns4KIIIβ	41
4.4.2	Krystalizace 14-3-3 <i>Lachanea thermotolerans</i> v komplexu peptidem PtdIns4KIIIβ	41
4.4.3	Měření difrakce rentgenového záření	42
4.4.4	Vytvoření modelu struktury	42
5	VÝSLEDKY	43
5.1	Příprava vektoru pro bakteriální expresi 14-3-3ζ.....	43
5.2	Expres a purifikace 14-3-3ζ a 14-3-3 <i>Lachanea thermotolerans</i>	44
5.3	Krystalizace 14-3-3 proteinu a rentgenová krystalografie	49
6	DISKUZE	55
7	ZÁVĚR	58
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

SEZNAM ZKRATEK

<i>ACBD3</i>	protein obsahující acyl-CoA vazebnou doménu 3, z angl. Acyl-CoA-binding domain containing protein 3
<i>BAD</i>	Agonista buněčné smrti asociovaný s Bcl-2, z angl. Bcl2-associated agonist of cell death
<i>BARS</i>	Brefeldin A-ADP ribosylovaný substrát
<i>Bcl2</i>	z angl. B cell lymphoma 2
<i>BMH</i>	z angl. Brain Modulosignalin Homologue
<i>CBB</i>	Comassie Brilliant Blue
<i>Cdc25C</i>	z angl. Cell division cycle 25 homolog C
<i>CIAP</i>	Telecí alkalická fosfatasa
<i>DNA</i>	Deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleic acid
<i>EDTA</i>	Ethylendiamin tetraoctová kyselina
<i>EtBr</i>	Ethidium bromid
<i>Hom 2</i>	Homologní region 2
<i>IGF1</i>	Inzulinu podobný růstový faktor 1, z angl. Insulin-like growth factor 1
<i>Jun</i>	Jun protoonkogen
<i>LKU</i>	z ang. Lipid kinase unique
<i>L.t.</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i>
<i>MAP3K5</i>	Mitogeny aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa 5
<i>MAPK</i>	Mitogeny aktivovaná protein kinasa
<i>MCM</i>	z angl. minichromosome maintenance
<i>MES</i>	2-(N-morpholino)ethanesulfonová kyselina
<i>mRNA</i>	Mediátorová ribonukleová kyselina
<i>NCS-1</i>	z angl. Neuronal calcium sensor
<i>NTA</i>	Nitrilotrioctová kyselina
<i>p53</i>	Buněčný tumorový antigen p53
<i>PGC</i>	Post Golgi přenašečový vesikul, z angl. Post Golgi carrier
<i>PH</i>	Plekstrin homologní doména
<i>PI4P</i>	Fosfatidylinositol-4-fosfát
<i>Pik1</i>	1-fosfatidylinositol 4-kinasa

<i>PKC</i>	Protein kinasa C
<i>PtdIns3K</i>	Fosfatidylinositol 3-kinasa
<i>PtdIns4K</i>	Fosfatidylinositol 4-kinasa
<i>PTPN3</i>	Tyrosin-protein fosfatasa nereceptorového typu 3
<i>Rab</i>	Ras-příbuzné proteiny Rab
<i>Raf</i>	z angl. Rapidly accelerated fibrosarcoma proto-oncogene serine/threonine protein kinase
<i>RMS</i>	z angl. root mean square
<i>SDK</i>	Sfingosin dependentní kinasa
<i>SDS</i>	Dodecylsírán sodný
<i>TCEP</i>	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
<i>TEMED</i>	Tetramethylethylendiamin

1 ÚVOD

1.1 Regulace funkce proteinů

Proteiny v buňce zprostředkovávají řadu rozličných funkcí, jež jsou nezbytné pro život organismu, jako je katalýza, řízení a regulace biochemických procesů, přenášení signálu, transport a přenášení látek, homeostázu, dostatek energie a materiálu potřebného pro biosyntézu, a mnoho a mnoho dalších. Regulace jejich funkce je proto naprosto klíčová pro správný průběh buněčných procesů, ekonomické nakládání s materiálem a plnění fyziologických potřeb buňky. Nedostatečná kontrola funkce proteinů nebo její nefunkčnost může způsobovat různé patologické stavy, od rakoviny přes diabetes po neurologickou dysfunkci [1].

Proteiny jsou regulovány mnoha mechanismy ve dvou obecných úrovních: (i) jejich množství (ii) aktivity. Regulace množství proteinu zahrnuje regulaci proteosyntézy, lokalizaci proteinů a jejich degradaci, regulaci ve formě syntézy různých isoform proteinu nebo syntézu proteinů v pre-pro-formách. Aktivitu proteinů ovlivňují různé kovalentní modifikace proteinu a vazba efektorové molekuly [2]. Tyto mechanismy se mohou prolínat a jeden protein může být regulován různými způsoby.

1.1.1 Regulace množství proteinu

1.1.1.1 Regulace proteosyntesy

Přestože je možné proces proteosyntesy regulovat na několika místech, nejčastějším a pro buňku nejvýhodnějším způsobem je kontrola iniciace transkripce, jejímž základem jsou u prokaryotických i eukaryotických buněk regulační úseky DNA, na něž se vážou regulační proteiny [3].

V prokaryotické buňce probíhá regulace transkripce především pomocí úseků DNA zvaných operátory, jež jsou součástí promotorů [4]. Na operátorech dochází k vazbě různých proteinových represorů zajišťující negativní kontrolu přepisu tím, že blokují promotor pro navázání RNA polymerasy. Na represor se dále mohou vázat různé nízkomolekulární korepresory nebo induktory, jež zesilují či zeslabují jeho vazbu na DNA. Positivní regulace je docílena vazbou aktivátoru na promotor. Tato vazba mění konformaci DNA a usnadňuje či zesiluje vazbu RNA polymerasy na DNA [4].

U eukaryot je kontrola transkripce komplexnější a může se odehrávat i na větší vzdálenosti. V prvé řadě je exprese genů ovlivněna kondenzací chromatinu a modifikacemi histonů [4].

Iniciace transkripce u eukaryot vyžaduje sestavení tzv. iniciačního komplexu na promotoru, tedy komplexu RNA polymerasy a obecných transkripčních faktorů, čímž se vytváří další prostor pro regulaci [3].

V eukaryotní buňce mohou být regulační úseky DNA vzdáleny až desítky tisíc nukleotidových bazí od regulovaného genu [4]. Takovými úseky jsou tzv. enhancery (z angl. enhance, zvýšit), s nimiž interagují další transkripční faktory a které vytváří ohyb v DNA, jenž umožňuje interakci proteinů vázaných na enhancerech s polymerasovým iniciačním komplexem [3]. Funkce těchto transkripčních faktorů je ovlivňována jejich modifikací či vazbou na další proteiny.

Kontrolována je nejen syntéza mRNA, ale i její posttranskripční úpravy, přenos z jádra, degradace, a translace, což dále ovlivňuje množství a podobu exprimovaného proteinu v buňce [4]. Tyto formy regulace jsou však pro buňku z ekonomického hlediska méně výhodné a tudíž i méně významné.

1.1.1.2 Regulace degradace

Eukaryotní buňka používá dvě hlavní dráhy degradace proteinů, proteolýzu v lysosomech a degradaci v proteasomu.

Lysosom je organela eukaryotních buněk specializovaná na štěpení a odbourávání buněčného materiálu. V lysosomech je nízké pH odpovídající pH optimu proteas a dalších enzymů. Směřování proteinů do lysosomů je proces, kdy splývá autofagosom obsahující materiál, který má být degradován, s lysosomem. Ve stavu hladovění jsou selektivně degradovány proteiny obsahující sekvenci Lys-Phe-Glu-Arg-Gln [3].

Proteasom je velký multiproteinový komplex sestávající z několika proteasových podjednotek, který štěpí proteiny až na peptidy o 3-22 aminokyselinách [5]. Degradaci v proteasomu předchází kovalentní připojení několika molekul ubikvitinu na protein. Nejdříve se vytváří isopeptidová vazba mezi aminoskupinou postranního řetězce lysinu cílového proteinu a karboxylovou skupinou ubikvitinu [5]. Na tento ubikvitin jsou poté vázány další molekuly ubikvitinu. Ubikvitin je vysoce konzervovaný protein o 76 a aminokyselinách [5]. Polyubikvitinylací je protein označen pro degradaci a směřován do proteasomu.

1.1.1.3 Regulace lokalizace proteinu

Specifické lokalizace proteinu v eukaryotické buňce je docíleno převážně lokalizačními sekvencemi v jeho primární struktuře, které směřují protein ven z buňky či do různých organel eukaryotické buňky např. do jádra, endoplasmatického retikula a plasmatické membrány [2]. Proces lokalizace může být přerušen modifikací proteinu či vazbou na jiný protein, která změní přístupnost lokalizační sekvence [2].

1.1.1.4 Isoformy

Další možnost regulace představuje existence různých isoform proteinu v buňce. Isoformy jsou proteiny s vysoce podobnou primární strukturou i biologickou funkcí [6], jež vznikají alternativním sestřihem mRNA či jako produkty duplikátních genů, které v evoluci prošly mutacemi [7].

Malé odlišnosti v sekvencích isoform mohou mít za následek preferenci jiných vazebných partnerů či substrátů, různou lokalizaci jak na úrovni subcelulární, tak tkáňové. Syntézou různých forem proteinu tak může organismus nezávisle kontrolovat podobné biologické procesy [7].

1.1.2 Regulace aktivity enzymu

1.1.2.1 Regulace malou molekulou

Proteiny mohou být regulovány vazbou malé molekuly, která vyvolává konformační změnu v proteinu či blokuje vazebná místa a mění tak jejich katalytickou aktivitu nebo i kvarterní strukturu [3].

Regulace malou molekulou často probíhá mechanismem alosterické regulace [3]. Alostericky regulovaný protein má několik vazebných míst na více podjednotkách, z nichž některé jsou katalytické, obsahující vazebná místa pro substrát, a některé regulační s vazebným místem pro efektor. Navázáním efektoru dojde ke konformační změně regulační podjednotky, která se pomocí protein-proteinových interakcí přenesou na katalytickou podjednotku, což má za následek změnu afinity katalytických podjednotek pro substrát [8].

Malá molekula se však může vázat i do vazebného místa pro substrát a fungovat jako negativní efektor zabraňující vazbě substrátu, v takovém případě jde o kompetitivní

inhibici [9]. Dalším mechanismem inhibice nezahrnující alosterickou regulaci je akompetitivní inhibice a nekompetitivní inhibice [10].

Mechanismy regulace malou molekulou jsou základem pro zpětnovazebnou inhibici, kdy konečný produkt biochemických pochodů inhibuje aktivitu proteinů, které jsou zapojeny do počátečních reakcí celého pochodu [10].

1.1.2.2 Protein-proteinové interakce

Proteiny mohou asociovat do komplexů a vytvářet kvarterní struktury. Asociace je zajištěna interakčními doménami se specifitou pro sekvence proteinového partnera [2]. Hlavní hnací silou asociace proteinů je především hydrofobní efekt, kdy se interakcí proteinů zakrývají jejich hydrofobní oblasti, které tak již nejsou v kontaktu s molekulami vody a tvoří termodynamicky stabilnější strukturu [11]. Dále se na vazbě podílejí vodíkové můstky a solné můstky, pro jejichž tvorbu je zapotřebí určité komplementarity v sekvenci proteinů. Tyto interakce společně se strukturní komplementaritou proteinů proto zajišťují specifitu interakce [11]. Stabilita některých proteinů je natolik malá, že se *in vivo* v jiném stavu než v komplexu nevyskytují, a tvoří obligátní komplexy [12].

Tvorba komplexu ovlivňuje funkci proteinu několika způsoby, ve výsledku může protein aktivovat i inaktivovat. Vázaný protein může měnit konformaci partnera nebo interagovat se sekvencemi důležitými pro funkci proteinu, jako jsou lokalizační sekvence nebo vazebná místa. Vazba proteinu tak má za následek změnu afinity k substrátu nebo změnu lokalizace proteinu. Asociací proteinu se však mohou formovat nová vazebná místa na rozhraní podjednotek, nová místa pro alosterickou regulaci nebo se může zvyšovat specifita již přítomných vazebných míst [13].

Zvláštním způsobem regulace je mechanismus intrasterické kontroly, kdy protein inhibuje sám sebe pomocí tzv. pseudosubstrátové domény, tato doména podobající se substrátu se váže do vazebného místa pro substrát a tak ho blokuje (autoinhibice) [14].

1.1.2.3 Kovalentní modifikace

Jedním z nejčastějších způsobů regulace skrze kovalentní modifikaci proteinu je fosforylace na hydroxylových skupinách postranních řetězců serinu, threoninu a tyrosinu. Až jedna třetina všech proteinů v buňce je fosforylována [15]. Díky přítomnosti kinas a fosfatas v buňce je fosforylace vratný proces a umožňuje tak reverzibilní regulaci. Fosforylace nejen, že mění náboj proteinu, ale také mění konformaci proteinu a tak

moduluje aktivitu proteinu, může ho aktivovat i inaktivovat [1]. Fosforylace také může na proteinu vytvořit nové rozpoznávací místo pro interakční domény jiných proteinů a je tak nezbytná pro asociaci některých proteinů [2].

Dalšími, avšak v rámci regulace aktivity proteinu méně významnými, posttranslačními modifikacemi jsou např. methylace, N-acetylce, sumoylace, glykosylace a lipidace.

1.1.2.3 Enzymatické štěpení proteinu

Některé proteiny, zvláště ty, jejichž působení je v místě tvorby nežádoucí, jsou syntetizovány v inaktivní proformě či preproformě. Aktivní forma vzniká nevratným odštěpením části polypeptidového řetězce proteolytickými enzymy ve specifickém místě [1].

1.2 14-3-3 proteiny

Rodina 14-3-3 proteinů je tvořena kyselými, evolučně vysoce konzervovanými regulačními proteiny o velikosti přibližně 26-29 kDa o přibližně 250 aminokyselinách, jež jsou exprimovány ve všech studovaných eukaryotických organismech [16]. Jejich jméno je odvozeno od čísla frakce při chromatografii na DEAE-celulose a následné škrobové elektroforese.

V savčích buňkách je rodina 14-3-3 proteinů tvořena sedmi isoformami (β , ϵ , η , γ , τ , ζ , σ) [17,18], z nichž každá je kódována vlastním genem. U isoform původně označených jako α a δ , se později ukázalo, že odpovídají formám β a ζ s fosforylovaným Ser185 v isoformě β či Ser183 v isoformě ζ [19]. Pět isoform se vyskytuje převážně v mozku, isoforma σ (také známý jako stratifin) je exprimována hlavně v epitelálních buňkách a isoforma τ v T buňkách [20]. Na subcelulární úrovni se 14-3-3 protein nachází nejvíce v cytoplasmě, ale byl nalezen i v jádru, perinukleárním prostoru, Golgiho aparátu a dokonce i na cytoplasmatické membráně [21]. 14-3-3 proteiny vykazují vysokou homologii nejen mezi savčími isoformami (70-90%), ale i mezi savčími a kvasinkovými formami (přibližně 70%) [22].

1.2.1 Funkce 14-3-3 proteinů a jejich vazební partneři

Hlavní funkcí 14-3-3 proteinů je vazba na proteinové ligandy, čímž regulují buněčné procesy, v nichž se tyto ligandy uplatňují. Množství a variabilita funkcí a struktur proteinů vázajících 14-3-3 ukazuje na obrovskou regulační schopnost 14-3-3 proteinu, viz tab. 1.1, str. 16. Vazebných partnerů bylo identifikováno již více než 700 [23] a 14-3-3 proteiny se tak zapojují do dějů jako je apoptosa, signalizace, regulace buněčného cyklu a dělení, buněčný metabolismus, transkripce a dalších.

14-3-3 proteiny se však neváží pouze na proteiny, vazbou na DNA kruciformy regulují i replikaci DNA [25]. DNA kruciformy jsou sekundární struktury DNA vyskytující se na eukaryotických počátcích replikace DNA. Tato interakce je závislá na fázi buněčného cyklu, jelikož se kruciformy formují na počátku S fáze, a je největší při G₁-S interfázi. 14-3-3 proteiny regulují replikaci DNA nejen vazbou na DNA kruciformy, ale také na proteiny prereplikačního komplexu, jako jsou MCM (z angl. minichromosome maintenance) proteiny a replikační faktor C.

14-3-3 protein je spojován s některými nemocemi. Skrze své ligandy, z nichž některé jsou onkogeny, tumorsupresorové geny či jejich produkty, má vliv v tumorigenese [26]. 14-3-3 má určitý význam i v neurodegenerativních procesech a onemocněních jako je Creutzfeld-Jakobova nemoc, Parkinsonova nemoc a Alzheimerova choroba [27].

1.2.2 Mechanismus regulace 14-3-3 proteiny

Způsobů, jakým 14-3-3 reguluje efektorový protein, je několik a mohou se vzájemně kombinovat. 14-3-3 protein může zakrývat vazebná místa ligandu pro jiné proteiny či DNA a tím snižovat schopnost ligandu se na tyto partnery vázat. Tento mechanismus se uplatňuje například při interakci 14-3-3 a BAD, kdy vazba 14-3-3 znemožňuje interakci BAD a Bcl2 a inhibuje tak iniciaci apoptosy [27].

Tab. 1.1: *Některé proteiny vázající se s 14-3-3 a jejich úloha. Převzato a upraveno [26].*

Ligand	Vlastnost	Vazebná sekvence	Effekt navázání 14-3-3
Raf-1	S/T kinasa	RSTS ²⁵⁹ TP, RSAS ⁶²¹ EP	Udržování aktivní i neaktivní konformace
BAD	Bcl-2 homolog	RHSS ¹¹² YP, RSRS ¹³⁶ AP	Inhibice proapoptických funkcí
Cdc25C	Y/T fosfatasa	RSPS ²¹⁶ MP	Blokace vstupu buňky do M-fáze
MAP3K5	S/T kinasa	RSIS ⁹⁶⁷ LP	Inhibice proapoptických funkcí
PTPN3	Y fosfatasa	RSLS ³⁵⁹ VE, RVDS ⁸⁵³ EP	-
PKC	S/T kinasa	RLS205NVS ²⁰⁸ , RTSS219AELS ²²³	Inhibice kinasové aktivity
IGF-1 receptor	Y kinasa	SVPLDPSASSSS1 ²⁸³ LP	-
p53	Transkripční faktor	KGQSTS ³⁷⁸ RH	Zvýšení interakce s DNA

Raf-1 – z angl. Rapidly accelerated fibrosarcoma proto-oncogene serine/threonine-protein kinase 1, *BAD* – Agonista buněčné smrti asociovaný s Bcl-2, z angl. Bcl2-associated agonist of cell death, *Bcl2* – z angl. B cell lymphoma 2, *Cdc25C* – z angl. Cell division cycle 25 homolog C, *MAP3K5* – Mitogeny aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa 5, *PTPN3* - Tyrosin-protein fosfatasa nerekceptorového typu 3, *PKCμ* - Protein kinasa C isoforma μ, *IGF1* – Inzulinu podobný růstový faktor 1, *p53* – Buněčný tumorový antigen p53

V některých případech, jako je regulace Cdc25 či telomerasy, může být vazebné místo pro 14-3-3 protein v blízkosti jaderné lokalizační nebo jaderné exportní sekvence. Tehdy vazba 14-3-3 na ligand ovlivní transport proteinů mezi jednotlivými kompartmenty buňky [27].

Vazba 14-3-3 také chrání proteiny před proteolysou nebo defosforylací. Takto jsou chráněny např. PIK4IIIβ, histony nebo Raf-1 [28].

Dalším mechanismem je konformační změna v enzymu po navázání 14-3-3 proteinu, kdy 14-3-3 funguje jako alosterický kofaktor a moduluje katalytickou aktivitu enzymu. Vazba 14-3-3 může mít aktivující efekt (např. u tyrosin hydroxylasy) ale i inhibující efekt (např. u kinasové aktivity MAP3K5) [27].

Díky svému rigidnímu uspořádání a tvorbě dimerů fungují 14-3-3 také jako proteinové lešení a poskytují tak prostor, na kterém spolu mohou asociovat proteiny a vytvářet komplexy. Takto se vytváří komplex např. Raf a PKC ζ [29].

1.2.3 Sekvence na cílovém proteinu

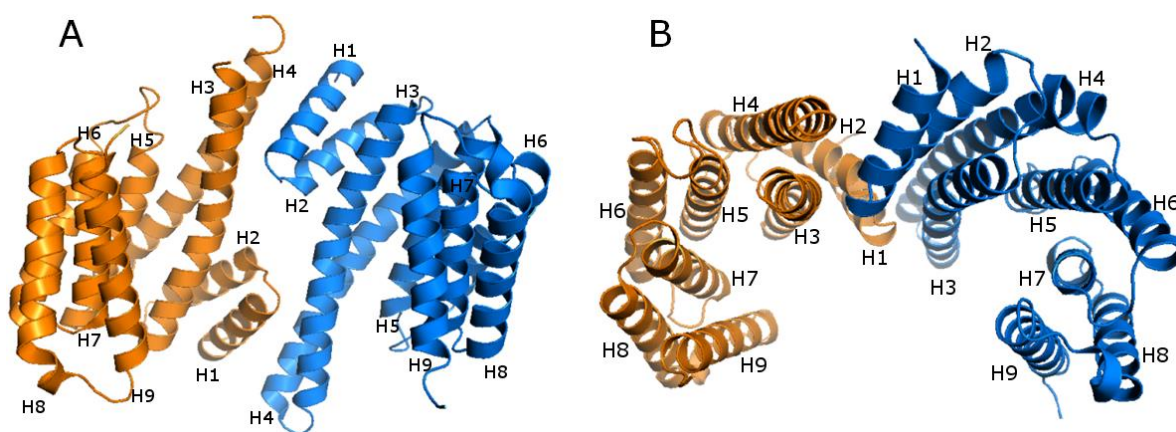
14-3-3 protein se váže na specifické sekvence obsahující fosforylovaný serin nebo threonin, byly však pozorovány i vazby na nefosforylované ligandy. Jako první identifikovali specifickou vazebnou sekvenci cílových proteinů 14-3-3 Muslin a kol. jako RSXpSXP, kde X je jakákoli aminokyselina a pS fosfoserin [30]. V následujících letech došlo k upřesnění této sekvence díky zjištěným preferencím k určitým aminokyselinám v pozicích -1, -2, +1 (vztaženo k fosfoserinu) na podobu R[S/Ar][+/Ar]pS/pT[L/E/A/M]P, kde Ar je jakákoli aromatická aminokyselina a + značí bazickou aminokyselinu [26,31]. Fosforylace serinu na pozici -2 nepřispívá k interakci [29]. Přítomnost argininu na -3 nebo -4 pozici je velmi důležitá, kdežto prolin se nachází v 50 % cílových sekvencí a vytváří na struktuře fosopeptidu ohyb. Na -5 pozici se nejčastěji vyskytuje arginin nebo leucin [32]. Dále byly charakterizovány další sekvence obsahující RX[Ar][+]pS/pT[L/E/A/M]P [33]. Tyto sekvence či sekvence jim podobné se vyskytují u vazebných partnerů 14-3-3 proteinu nejčastěji a jsou rozpoznávány všemi 14-3-3 isoformami [31].

Dále byly identifikovány další, méně zastoupené motivy, například C-terminální sekvence SW(pT)X-COOH [18]. Proteiny obsahující tuto sekvenci váží 14-3-3 slaběji. U rostlin se vyskytuje také vazebná sekvence LX(R/K)SX(pS/pT)XP [32].

Některé vazebné proteiny 14-3-3 obsahují těchto specifických sekvencí více a mohou tak interagovat s oběma monomery dimerního 14-3-3, výsledkem může být změna konformace ligandu. Je pravděpodobné, že jeden z těchto motivů je hlavním vazebným motivem, na jehož fosforylaci závisí vazba na 14-3-3 protein. Další sekvence váže 14-3-3 protein mnohem slaběji a samotná neposkytuje dostatečnou afinitu k 14-3-3 pro vazbu, vazba této sekvence se může uskutečnit až po navázání hlavní sekvence na 14-3-3 [34]. Celkově však posiluje interakci mezi proteinem a 14-3-3, která tak může být několikrát silnější [33].

1.2.4 Struktura 14-3-3 proteinů

14-3-3 protein má vysoce helikální strukturu. Je tvořen devíti antiparalelními α helixy, jež se označují H1-H9 a jsou spojeny krátkou β otáčkou, viz obr. 2.1. Všech devět α helixů formuje strukturu vazebného žlábků, kdy čtyři směřují dovnitř žlábků (H3, H5, H7, H9) a zbylých pět ven (H1, H2, H4, H6, H8), viz obr. 2.1B. Nejdelší jsou α helixy H3 a H4. Helixy lemující žlábek vytváří amfipatickou oblast, H3 a H5 obsahují nabitě nebo polární aminokyselinové zbytky, H7 a H9 představují hydrofobní část vystavující na svém povrchu několik leucinových zbytků [35]. H3 α helix je ohnutý v konzervovaném Gly53, což koresponduje s prolinem na +2 pozici k fosforylovanému serinu ve specifických vazebných sekvencích pro 14-3-3 [27,35].



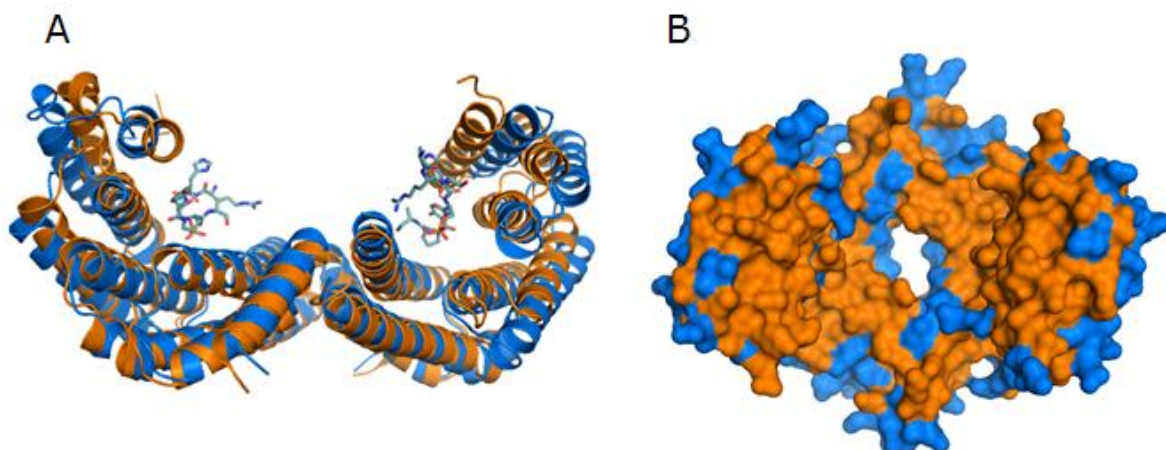
Obr. 2.1. *Struktura dimerního 14-3-3*. Identifikační PDB kód 1QJB [36]. (A) boční pohled. (B) pohled shora.

Aminokyselinová sekvence α helixů opisující žlábek je vysoce konzervovaná, viz obr. 2.2B, str. 19. U 17 studovaných isoforem 14-3-3 proteinu je 104 aminokyselinových zbytků konzervovaných a většina spadá právě na jeho amfipatickou oblast [35]. Právě tato oblast 14-3-3 proteinu je zodpovědná za vazbu ligandu. Méně je konzervovaná sekvence α helixů nacházejících se na vnějším povrchu 14-3-3, které mohou dále interagovat s ligandem 14-3-3 proteinu a zajišťovat tak isoformní specifitu vazby.

Sekvenčně nejvíce variabilní částí isoformů 14-3-3 proteinu je C-konec, který je ale i přesto vždy kyselý a reguluje interakce 14-3-3 proteinu interakcí s vazebným žlábkem volného 14-3-3 [37], pravděpodobně s jeho basicou oblastí tvořenou lysinovým a několika argininovými zbytky, jež se jinak přímo podílejí na vazbě ligandu [35]. Na C-terminálním konci u isoformů ζ a τ bylo nalezeno fosforylační místo na pozici 232 pro

kasein kinasu Ia, což naznačuje další možnost regulace 14-3-3 proteinů prostřednictvím jeho C-konce (v sekvenci 14-3-3 proteinů se vyskytují další fosforylační místa, jež se účastní regulace jeho dimerizace a vazby na ligand [37], viz kap. 1.2.6, str. 20).

Strukturní odlišnosti jednotlivých isoform 14-3-3 jsou velmi malé s odchylkami u vázaných 14-3-3 menšími než 2Å, nejvíce se liší délka smyček spojující α helixy a délka α helixů H3 a H4 [31]. Největší rozdíl je mezi strukturami 14-3-3 ζ a 14-3-3 β , která zaujímá více otevřenou strukturu, viz obr.2.2A.



Obr. 2.2: *Shody a odlišnosti isoform 14-3-3*. A) Strukturní odlišnosti ζ a β isoform 14-3-3. Isoforma ζ zobrazena oranžově, β isoforma modře, ligand zobrazen šedivě, identifikační PDB kód 1QJB [36] a 2C23 [38]. B) Sekvenční podobnost savčích isoform 14-3-3 proteinu znázorněná na 14-3-3 ζ . Aminokyselinové zbytky naprosto konzervované zobrazeny oranžově, odlišné modře, identifikační PDB kód 1QJB.

Ze studií krystalových struktur 14-3-3 vyplývá, že rozdíl mezi volným a vázaným 14-3-3 je minimální, což poukazuje na velkou rigiditu jeho struktury, jež je zajištěna nejspíše velkým množstvím interakcí mezi jeho α helixy [27].

1.2.5 14-3-3 protein jako dimer

14-3-3 proteiny se vyskytují ve formě dimeru, v němž je jeden monomer otočen o 180° vůči druhému monomeru, viz obr. 2.1A, str. 18. Dimer tvoří velký negativně nabitý kanál 35 Å vysoký, 35 Å široký a 20Å hluboký [39], viz obr. 2.1B, str. 18. Na tvorbě dimeru se podílejí konzervované N-koncové oblasti 14-3-3 monomerů a to tak, že H1 a H2 jednoho monomeru interaguje s H3 a H4 druhého monomeru [35]. Dimerní struktura je udržována pomocí solných můstků, jejichž počet se liší mezi isoformami 14-3-3 proteinu. U všech

isoformem se nachází solný můstek mezi Arg18-Glu89 a s výjimkou isoformy ϵ i mezi Asp21-Lys85 (aminokyselinové zbytky číslovány podle isoformy ζ) [31]. U isoformy ζ je navíc vytvořen solný můstek mezi Glu5-Lys74 [31]. Interakce je dále zajištěna dalšími polárními i hydrofobními aminokyselinami na rozhraní monomerů, u 14-3-3 ζ jsou to Leu12, Ala16, Ser58, Val62, Ile65, a Tyr82 [31].

Tvorba homodimerů a heterodimerů je isoformově specifická. Přestože je N-konec 14-3-3 poměrně konzervovaný, obsahuje malé rozdíly v sekvenci, jež jsou však důležité pro preferenci partnera k tvorbě dimeru. Výskyt postranních řetězců neobvyklých pro 14-3-3 protein v isoformě σ určuje 14-3-3 σ k tvorbě homodimerů. Naopak isoforma ϵ se vyskytuje výhradně ve formě heterodimerů.

Přestože je dimerní struktura 14-3-3 základem pro funkci 14-3-3, mohou v závislosti na své stabilitě některé isoformy 14-3-3 existovat i v monomerní podobě, isoformy β a η jsou monomerní až ve třiceti procentech případů [38].

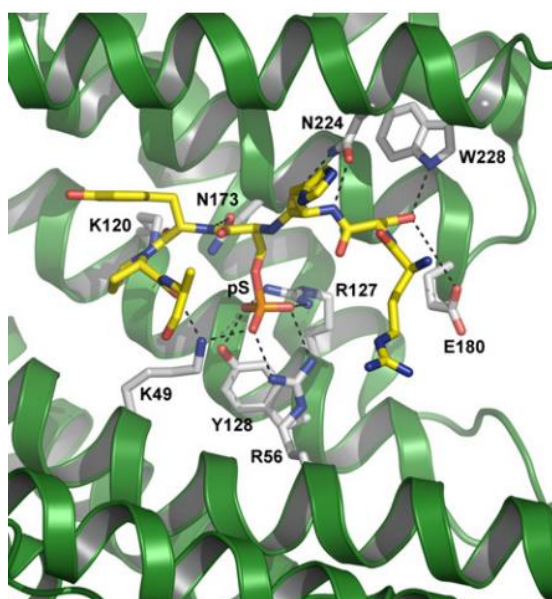
1.2.6 Fosforylace 14-3-3 proteinu – regulace funkce

Fosforylace 14-3-3 proteinu na jeho serinových, threoninových i tyrosinových zbytcích je (společně s existencí více na sobě nezávisle exprimovaných isoform 14-3-3 a jeho různou subcelulární i tkáňovou lokalizací) jedním ze způsobů jeho regulace. Fosforylační místa jsou mezi isoformami poměrně variabilní [40], což umožňuje specifickou regulaci isoform 14-3-3. Fosforylace 14-3-3 ovlivňuje nejen vazbu ligandu, ale i dimerizaci 14-3-3 [31]. Např. sfingonin-dependentní kinasa 1 a MAPK aktivovaná kinasa 2 fosforylují Ser58 isoformy ζ a jemu odpovídající aminokyselinové zbytky u isoform β a η . Jelikož se Ser58 účastní interakcí důležitých pro dimerizaci 14-3-3, vede fosforylace v tomto místě k rozpadu dimerní struktury 14-3-3 [31]. Dalším fosforylačním místem je Ser184 isoformy β , σ a ζ (aminokyselinový zbytek číslován podle isoformy ζ) [40]. Fosforylace tohoto serinu kinasou c-Jun N-terminální kinasou má často za následek snížení afinity k ligandu, vede k rozpadu např. komplexu 14-3-3 a BAD [40]. Stejně tak fosforylace na Ser232 respektive Thr232 14-3-3 τ a ζ kasein kinasou I α vede k inhibici vazby ligandu [40]. Dále je vazebná schopnost 14-3-3 proteinu regulována autoinhibičním mechanismem, kdy C-konec 14-3-3 proteinu interaguje s aminokyselinovými zbytky vazebného žlábků a blokuje ho [35] (viz. kapitola 1.2.4, str. 18).

1.2.7 Vazba ligandu na 14-3-3 proteiny

Interakci s ligandem zajišťují na 14-3-3 proteinu hlavně vysoce konzervované aminokyselinové zbytky Lys49 a Arg56 nacházející se na α helixu H3 a Arg127 a Tyr128 na α helixu H5 [33] (aminokyselinové zbytky číslovány podle 14-3-3 ζ). Arg56, Arg127 a Lys49 vytváří solné můstky s fosfátem fosfopeptidu a hydroxyskupina Tyr128 vytváří s fosfátem vodíkovou vazbu [31], viz obr. 2.3. Aminokyselinové zbytky Lys49, Arg127 a Tyr128 se podílejí na vazbě fosforylovaného i nefosforylovaného ligandu u všech isoform 14-3-3 [31]. Další aminokyselinové zbytky se mohou zapojovat do vazby ligandu interakcí s jeho páteří, u 14-3-3 ζ např. Asn173, Asn224 a Lys120 skrze své amido- či aminoskupiny na postranních řetězcích.

Poté, co se ligand naváže do vazebného žlábků, může interagovat i s dalšími oblastmi 14-3-3. Bylo identifikováno několik takových oblastí, mezi nejdůležitější patří smyčka mezi H8 a H9, jež se významně sekvenčně liší jen u isoformy σ a určuje selektivitu 14-3-3 σ [31].



Obr. 2.3: Detail interakce mezi 14-3-3 a ligandem s vazebnou sekvencí typu $R[S/Ar][+/Ar]pS/pT[L/E/A/M]P$. Převzato z [27].

14-3-3 proteiny mohou vázat velké množství partnerů, mezi které patří např. fosfatidylinositol 4-kinasa III β (viz kapitola 1.3.4, str. 24), proteiny Raf, BAD či PKC (viz kapitola 1.2.1, str. 15). Skrze tyto interakce participuje 14-3-3 protein na regulaci celé řady buněčných procesů.

1.3 Fosfatidylinositol 4-kinasa III β

1.3.1 Fosfatidylinositol kinasy

Fosfatidylinositol kinasy patří do skupiny “lipid-kinas” a jsou zodpovědné za fosforylaci fosfatidylinositolu na hydroxylových skupinách třetího, čtvrtého nebo pátého uhlíku inositolového kruhu. V savčích buňkách tak tvoří sedm různých fosfátových derivátů fosfatidylinositolu, tzv. fosfoinositidů [41]. Fosfatidylinositol 4-kinasy (PtdIns4K) katalyzují přenos fosfátové skupiny na hydroxylovou skupinu čtvrtého uhlíku nefosforylovaného inositolového kruhu. Fosfatidylinositol-4-fosfát (PI4P) je nejen prekursorem fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfátu, ale účastní se i různých signalizačních drah, vesikulárního transportu či metabolismus lipidů [41]. Právě v důsledku syntézy PI4P hrají PtdIns4K důležitou roli v buněčné regulaci.

V savčích buňkách existují čtyři PtdIns4K, které se podle svých biochemických vlastností dělí do dvou typů. Typ II zahrnující PtdIns4KII α a PtdIns4KII β je inhibován adenosinem, kdežto kinasy typu III, kam spadají PtdIns4KIII α a PtdIns4KIII β , jsou inhibovány wortmaninnem a dalšími inhibitory PtdIns3K (fosfatidylinositol 3-kinasa) [42]. Inhibice PtdIns4KIII inhibitory PtdIns3K se odvíjí od sekvenční podobnosti těchto enzymů, zejména v jejich katalytické doméně [42, 43].

1.3.2 Výskyt a funkce fosfatidylinositol 4-kinasy III β

Fosfatidylinositol 4-kinasa III β je rozpustný protein o velikosti přibližně 92 kDa exprimovaný především v srdci, pankreatu a kosterní svalovině [44]. Na subcelulární úrovni se PtdIns4KIII β nachází převážně vázaný na cytosolické straně membrán Golgiho aparátu, v menší míře se nachází i v jádře a v nedávné době byla nalezena i na membránách lysosomů [45]. Zakotvení PtdIns4KIII β na membránu Golgiho aparátu je zprostředkováno proteiny ACBD3 (z angl. Acyl-CoA-binding domain containing proteins) a NCS-1 (z angl. Neuronal calcium sensor, také známý jako Frequentin) [43]. Vazba ACBD3 i NCS-1 s PtdIns4KIII β také pozitivně reguluje lipid-kinasovou aktivitu PtdIns4KIII β [46].

PtdIns4KIII β má v Golgiho aparátu několik funkcí, z nichž se většina odvíjí od její katalytické aktivity. Skrze syntézu PI4P a jeho vazebné proteiny reguluje vesikulární transport na plasmatickou membránu, biosyntézu lipidů a jejich nevesikulární export

z Golgiho aparátu [42, 47]. Přítomnost PtdIns4KIII β je také nutná pro zachování struktury a organizace Golgiho aparátu [48]. Další, nekatalytickou funkcí PtdIns4KIII β je vazba GTP vázaného Rab11 (Ras-příbuzné proteiny Rab) [49]. Rab proteiny se podílí na vesikulárním transportu [42, 49].

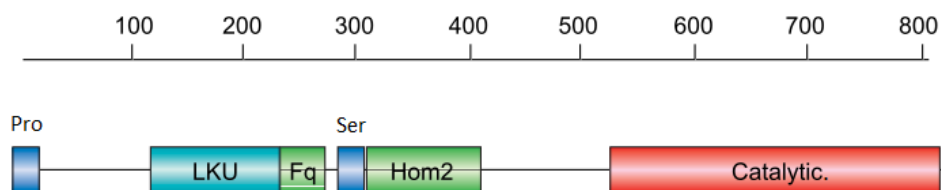
PtdIns4KIII β se podílí se na syntéze PI4P i v jádře. Díky dvěma nukleárním lokalizačním sekvencím a jedné nukleární exportní sekvenci je transportována přes jadernou membránu a pohybuje se v obou směrech mezi jádrem a cytoplasmou [50]. Fyziologická funkce PtdIns4KIII β v jádře však dosud nebyla objasněna [50, 51].

V lysosomech koordinuje třídění materiálu pro vesikulární transport a tvorbu vesikulů [45].

1.3.3 Struktura fosfatidylinositol 4-kinasy III β

V převážně helikální struktuře PtdIns4KIII β se vyskytuje několik domén či regionů, viz obr. 3.1, str. 24, z nichž některé vykazují podobnost s PtdIns3K. To se týká především poměrně konzervované C-koncové katalytické domény, méně již tzv. LKU (z angl. Lipid kinase unique) domény, jež se vyskytuje blíže N-konci a je tvořena α helixy [42, 52]. Katalytická doména na svém N-konci tvoří antiparalelní β strukturu a na C-konci má helikální strukturu [52]. Centrální Hom2 region (homologní region 2) s vazebným místem pro Rab11 (viz obr. 3.1, str. 24) vykazuje vysokou podobnost s kvasinkovým homologem Pik1 (1-fosfatidylinositol 4-kinasa) [42, 43].

Mezi katalytickou a Hom2 doménou se nachází vazebné místo pro NCS a oblast s množstvím serinů, viz obr. 3.1, str. 24 [42]. V této oblasti se nachází několik fosforylačních míst, např. Ser258, Ser266 a Ser294. Fosforylace Ser258 a Ser266 má vliv na směřování PtdIns4KIII β kinasy na membrány Golgiho aparátu, fosforylace Ser294 protein-kinasou D významně zvyšuje lipid-kinasovou aktivitu a podmiňuje vazbu 14-3-3 proteinu, viz kap. 1.3.4, str. 24 [43]. Na N-konci se nachází jaderná lokalizační a exportní sekvence a oblast bohatá na proliny [51, 42].



Obr. 3.1: *Organizace struktury PtdIns4KIIIβ*. Převzato a upraveno z [52]. Číselná osa označuje pořadí aminokyselin.

Pro – oblast bohatá na Prolin, *LKU* – LKU doména, z ang. lipid kinase unique, *Fq* – vazebné místo pro Frequenin (NCS), *Ser* – oblast bohatá na Serin, vazba 14-3-3 proteinu, *Hom2* – Hom2 doména, vazba Rab proteinu, *catalytic.* – katalytická doména

1.3.4 Interakce PtdIns4KIIIβ s 14-3-3 proteinem

Phosphatidylinositol 4-kinasa asociuje se všemi sedmi savčími isoformami 14-3-3 proteinu [51]. 14-3-3 protein se váže na PtdIns4KIIIβ v místě Ser294, který je součástí sekvence RTASNP podobající se vazebné sekvenci 14-3-3 proteinu R[S/Ar][+ /Ar]pS/pT[L/E/A/M]P (viz kap. 1.2.3). Vazba 14-3-3 proteinu v tomto místě je závislá na předešlé fosforylaci Ser294 proteinkinasou D, avšak 14-3-3 se v menší míře váže i na PtdIns4KIIIβ s mutovaným Ser294, což naznačuje možnost existence dalšího vazebného místa [51].

14-3-3 protein funguje jako pozitivní regulátor PtdIns4KIIIβ, jeho vazba chrání pSer294 před působením fosfatas [51]. Defosforylace má za následek zásadní snížení lipid-kinasové aktivity PtdIns4KIIIβ. Vazba 14-3-3 proteinu na PtdIns4KIIIβ tak zajišťuje nepřetržitou syntézu PI4P v Golgiho aparátu.

Interakce s 14-3-3 proteinem nejen stabilizuje PtdIns4KIIIβ v aktivní formě, ale umožňuje i tvorbu většího komplexu 14-3-3γ, PtdIns4KIIIβ a BARS (Brefeldin A-ADP ribosylovaný substrát) proteinů, kde dimerní 14-3-3γ funguje jako proteinové lešení [53]. Tento komplex se uplatňuje v transportu z Golgiho aparátu na basolaterální plasmatickou membránu polarizovaných buněk za pomoci velkých, neopláštěných, post-Golgi přenašečových vesikul, tzv. PGC (z angl. post-Golgi carrier) [53].

Další možnost regulace PtdIns4KIIIβ 14-3-3 proteinem vyplývá ze skutečnosti, že kinasa obsahuje ve své primární struktuře jaderné lokalizační a exportní sekvence. Interakcí s těmito sekvencemi mohou 14-3-3 proteiny ovlivňovat transport svých vazebných partnerů mezi jádrem a cytoplasmou, viz kap. 1.2.2, str. 15. Studie v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* prokázaly závislost množství kvasinkového homologa

PtdIns4KIII β Pik1 v jádře na interakci s homology 14-3-3 proteinů *Saccharomyces cerevisiae* Bmh1 a Bmh2 (z angl. Brain Modulosignalin Homologue) [55]. V případě nedostatku živin se nachází Pik1 v cytoplasmě, kde vytváří komplex s Bmh1 a Bmh2. Vazba 14-3-3 znemožňuje transport Pik1 do jádra a zvyšuje tak její množství dostupného pro Golgiho aparát [54]. Na membráně vázaná Pik1 interaguje s 14-3-3 v menší míře [54]. V savčích buňkách nebyl mechanismus regulace podobný výše popsanému PtdIns4KIII β pozorován [51].

Interakce mezi 14-3-3 proteiny a PtdIns4KIII β byla zatím studována převážně molekulárně-biologickými a biochemickými metodami, především na úrovni enzymatické aktivity PtdIns4KIII β a jejích mutantů, avšak detailnější pohled na strukturní hledisko interakce 14-3-3 proteinů a PtdIns4KIII β dosud chyběl.

1.4 Rentgenostrukturní analýza

Rentgenostrukturní analýza patří společně s nukleární magnetickou rezonancí mezi nejpoužívanější metody pro studium třídimenzionální struktury proteinů a jiných biomakromolekul. V případě rentgenostrukturní analýzy proteinů dochází k difrakci monochromatického rentgenového záření na monokrystalu proteinu. Výsledkem je difrakční obrazec, soubor tzv. reflexí o různé intenzitě a difrakčním úhlu, který je typický pro daný krystal. Interpretací difrakčního obrazce po rozřešení fázového problému lze získat mapu elektronové hustoty proteinu a vytvořit model struktury proteinu. Použití právě rentgenového záření pro strukturní studie se odvíjí od jeho vlnové délky, jež se pohybuje od 0,1 Å do 100 Å [55]. Při krystalografických měřeních se používá záření o vlnové délce přibližně 1 Å, jež odpovídá vzdálenostem mezi atomy v molekule [55].

1.4.1 Difrakce rentgenového záření

Rentgenové záření může s hmotou interagovat více způsoby, pro krystalografii je však základem jeho difrakce na elektronech atomů krystalu, tedy elastický rozptyl záření a jeho následná konstruktivní interference. Při dopadu rentgenového záření na krystal se rozptyluje přibližně 1% dopadajících paprsků, zbytek krystalem prochází v původním směru paprsku [56].

Fyzikální podstata rozptylu spočívá ve skutečnosti, že rentgenové záření je krátkovlnné elektromagnetické vlnění. Elektrické pole rentgenového záření (jako každého elektromagnetického vlnění) interaguje s elektrony atomů. Tyto elektrony se rozkmitávají stejnou frekvencí jako je frekvence dopadajícího elektromagnetického vlnění a stávají se zdrojem sekundárního rentgenového záření [56]. Takové záření může být emitováno do všech směrů a v případě elastického rozptylu má stejnou vlnovou délku jako dopadající záření [56].

Vlny rozptýlené na různých elektronech se v závislosti na poloze elektronů mohou lišit svou fází. Právě na fázovém posunu vln je závislá povaha interference těchto vln [55]. Ke konstruktivní interferenci dochází, pokud jsou rozptýlené paprsky vzájemně ve fázi, tedy je-li dráhový rozdíl vln rovný celočíselnému násobku vlnové délky [55]. Následným součtem amplitud vlnění se záření zesiluje.

Difrakci na krystalu si lze představit jako odraz záření na paralelních rovinách krystalové mříže tvořených uzlovými body mříže, jež jsou charakterizovány Millerovými indexy h, k, l . Při odrazu záření na těchto rovinách se úhel dopadu záření rovná úhlu odrazu [57]. V takovém případě může být dráhový rozdíl záření rozptýleného na dvou sousedních rovinách, jenž je roven celočíselnému násobku n vlnové délky λ , vztažen na vzdálenost d těchto rovin a úhlu dopadajícího záření θ . Tato skutečnost je vyjádřena Bragovým zákonem ($n\lambda = 2d\sin\theta$) [58].

Pouze při splnění Bragova zákona záření konstruktivně interferuje [59]. Jelikož je většina krystalografických experimentů prováděna s monochromatickým rentgenovým zářením, kdy je vlnová délka konstantní, je pro každé roviny ve vzdálenosti d Bragovým zákonem definován úhel dopadu záření, pod kterým bude na těchto rovinách docházet k difrakci. Pro splnění Bragova zákona pro více souborů krystalových rovin se při měření difrakce krystalem rotuje. [58]

Difraktované vlny se v difrakčním obrazci projeví jako reflexe, jejichž intenzita je závislá na amplitudě dopadajícího záření a tedy na poloze atomů v elementární buňce [57]. Poloha reflexí je závislá na směru difraktovaného záření, nese v sobě informaci o vzdálenostech krystalových rovin, rozměrech elementární buňky a symetrii krystalu [57, 59]. Jak je z Bragova zákona patrné, čím větší je úhel odrazu, tím je vzdálenost rovin menší. Reflexe vzdálenější od středu difrakčního obrazce tak poskytují větší rozlišení a nesou v sobě informace o detailnější struktuře molekuly [57].

1.4.2 Vytvoření mapy elektronové hustoty, fázový problém a jeho řešení

Mapu elektronové hustoty, tedy jak jsou elektrony rozmístěny v prostoru, lze z difrakčního obrazce, respektive strukturních faktorů, získat výpočtem inverzní Fourierovy transformace [60]. Strukturní faktor je v jednoduchosti komplexní číslo popisující vlny difraktované na souboru paralelních krystalových rovin. Reálná část vyjadřuje amplitudu záření a imaginární část odpovídá fázi tohoto záření [58, 60]. Pro výpočet inverzní Fourierovy transformace je tedy nutné znát jak amplitudu, tak fázi difraktovaných vln. Amplitudu vln lze odvodit z intenzit reflexí, intenzita reflexí roste se čtvercem amplitudy, fáze vln jsou však při měření ztraceny a musí proto být určeny. Existuje několik metod určení fáze, ve strukturní analýze proteinů se nejčastěji používá metoda isoformního nahrazení, molekulového nahrazení a anomálního rozptylu [58].

1.4.2.1 Metoda isoformního nahrazení

Metoda isoformního nahrazení spočívá v měření difrakce záření na různých krystalech stejného proteinu. V jednom z krystalů je protein ve svém nativním stavu, další krystaly obsahují uměle inkorporované těžké atomy. Pro úspěšné určení strukturních faktorů je zapotřebí alespoň dvou různých modifikovaných krystalů [58]. Těžké atomy změní intenzitu difraktovaného záření a tedy i strukturní faktor. V ideálním případě nezmění strukturu molekuly a uspořádání molekul v krystalu. Rozdíl v difrakčních obrazcích je dán příspěvkem iontů těžkých kovů. Z tohoto rozdílu je možné zjistit rozmístění těžkých atomů v elementární buňce, vypočítat jejich strukturní faktory a následně i strukturní faktory odpovídající nativnímu proteinu [55].

1.4.2.2 Metoda molekulového nahrazení

Pokud je známa struktura proteinu podobného s proteinem, jehož struktura je určována, je možné využít pro zjištění strukturních faktorů model známého proteinu [57]. Při metodě molekulového nahrazení je model podobného proteinu umístěn do elementární buňky krystalu. Je však nutné model umístit ve správné orientaci na správné místo v elementární buňce. Pro to je nutné najít šest souřadnic, tři rotační úhly a tři polohové parametry, které poskytují nejmenší hodnotu R [55]. Hodnota R vyjadřuje rozdíl mezi naměřenými daty a vkládaným modelem známého proteinu.

1.4.2.3 Metoda anomálního rozptylu

Při této metodě je ozařován krystal s inkorporovanými těžkými atomy rentgenovým zářením o takové vlnové délce, kdy je energie záření blízká energii elektronového přechodu, tedy je blízká jeho absorpční hraně [57]. V rozmezí vlnových délek používaných při měření difrakce krystalů je toto splněno právě pro obsažené těžké atomy [57]. V důsledku anomálního rozptylu se mění jak amplituda, tak fáze rozptýleného záření [55]. Fázi lze z takových měření získat podobně jako při metodě isoformního nahrazení (viz kap. 1.4.2.1, str. 27).

1.4.3 Modelování struktury

Difrakční obrazec poskytuje pouze mapu elektronové hustoty, do které je nutné zasadit model odpovídající naměřeným datům. Při zpracovávání modelu struktury se model průběžně zpřesňuje procesem tzv. refinementu (z angl. refinement - zdokonalení), kdy je pomocí výpočetní techniky porovnáván tvořený model s experimentálními daty a je pozměňován tak, aby s nimi co nejvíce souhlasil. Správnost vytvořeného modelu je vyjadřována R faktorem, který vyjadřuje rozdíl mezi experimentálně získanými strukturními faktory a strukturními faktory vypočítanými z modelu [60].

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo získat krystal komplexu 14-3-3 ζ proteinu s peptidem z fosfatidylinositol 4-kinasy III β a komplexu 14-3-3 proteinu kvasinky *Lachancea thermotolerans* s týmž peptidem a vyřešit model struktury obou těchto komplexů.

Dosažení tohoto cíle zahrnovalo tyto dílčí kroky:

- příprava expresního vektoru pro bakteriální expresi 14-3-3 ζ
- bakteriální exprese a purifikace 14-3-3 ζ
- bakteriální exprese a purifikace 14-3-3 proteinu kvasinky *Lachancea thermotolerans*
- krystalizace proteinu 14-3-3 ζ v komplexu s fosfopeptidem z fosfatidylinositol 4-kinasy III β
- krystalizace proteinu 14-3-3 kvasinky *Lachancea thermotolerans* v komplexu s fosfopeptidem z fosfatidylinositol 4-kinasy III β
- rentgenostrukturní analýza krystalů a vytvoření modelů struktur obou komplexů

3 PŘÍSTOJE A MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	Adventurer Pro, Ohaus
Aparatura a zdroj pro horizontální elektroforézu	EV 231, Consort
Aparatura pro vertikální elektroforesu	Mini-PROTEIN Tetra System, Bio-Rad
Centrifugy	Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1, Eppendorf Allegra X-15 R Centrifuge, rotor SX47910A, Beckmann Coulter Sorval Evolution RC, rotor SLC-6000, Thermo Scientific Avanti Centrifuge J30I, rotor JLA-16.250, Beckmann Coulter
EmulsiFlex	EmulsiFlex C3, Avestin
Fotoaparát	E-620, Olympus
Homogenizátor podle Dounceho	PYREX
HPLC systém	AKTA purifier, GE Healthcare Life Sciences
Kolona pro gelovou chromatografii	Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare Life Sciences
Koncentrátor	Amicon Ultra 30 kDa, Millipore Ireland Ltd.
Krystalizační robot	CrystalGryphon, Art Robbins Instruments Oryx8, Douglas Instruments
Magnetická míchačka	ARE, VELP
Mikroskop	SZX10, Olympus
Mikrospektrofotometr	Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop
Předvážky	EMB 500-1, Kern
Rotační inkubátor	Innova 44, New Brunswick
Rotátor	Multi RS-60, Biosan
Termocykler	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line

Termostat	IPP 400, Memmert
UV fotoaparát	QUANTUM ST4-1100, Vilbert Lourmat
Vodní lázeň	JB Aqua 2 Plus, Grant
Vortex	Gene 2, Scientific industries
Zdroj pro vert elfo	PowerPac Basic, Bio-Rad

3.2 Materiál a chemikálie

Agarosa	Agarosa SERVA pro DNA elektroforesu, SERVA
Akrylamid, Bisakrylamid	Rotiphorese gel 30 (37,5:1), Carl Roth
Ampicilin	Carl Roth
B-merkaptioethanol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich
EDTA (ethylendiamin tetraoctová kyselina)	Carl Roth
Ethidium bromid	Carl Roth
Kyselina mravenčí	Carl Roth
Ni-NTA agarosa	Protino
Peptid PtdIns4KIII β (sekvence LKRTASNPKV)	Připraven v laboratoři vědecko-servisní skupiny dr. Mayera
Peroxodisíran amonný	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Standard pro DNA elektroforesu	Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific
Standard pro proteinovou elektroforesu	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Scientific
TCEP	Thermo Scientific
TEMED	Carl Roth
Tris-Cl	Carl Roth

3.2.1 Roztoky, pufrы a média

CBB barvicí roztok	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250, 1,5 M CH ₃ COOH, 50% (V/V) methanol
Eluční pufr	50 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl, 3 mM BME, 300mM imidazol, 10% (V/V) glycerol
Ligační pufr	5x Rapid Ligation pufr , Thermo Scientific
LB agar podle Lennoxе	P-Lab
LB medium podle Lennoxе	P-Lab
Nanášecí pufr pro DNA elektroforesu	6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific
Nanášecí pufr pro SDS elektroforesu	4x Roti Load [®] 1, Carl Roth
Promývací pufr	50 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl, 3mM BME, 40 mM imidazol, 10% (V/V) glycerol
Pufr pro gelovou chromatografii	20 mM Tris (pH 7,4), 100 mM NaCl, 1mM β-merkaptоethanol
Pufr pro SDS elektroforesu (Tris-glycinový pufr)	25 mM Tris NaCl, 0,25 M glycin, 0,1 % (W/W) SDS, pH 8,8
TBE pufr	89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2mM EDTA, pH 8,3
Sady krystalizačních roztoků	JCSG Core Suite I, III, IV, Qiagen Proplex, Molecular Dimensions Trinity, připravena dr. Martinem Klímou
Sady pro purifikaci DNA	QIAquick PCR Purification kit ,Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit ,Qiagen
Restrikční pufr	10x Fast Digest Green pufr, Thermo Scientific
TAE pufr	40 mM Tris, 20 mM CH ₃ COOH, 1mM EDTA, pH 8,0
ZY médium	1% (W/V) trypton, 0,5% (W/V) kvasniční extrakt, 2,8 mM glukosa, 6 mM laktosa, 0,5% (V/V) glycerol, 1 mM MgCl ₂ , 25 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Na ₂ HPO ₄

3.2.2 Enzymy

CIAP	Thermo Scientific
Endonukleasa NcoI	Thermo Scientific
Endonukleasa NotI	Thermo Scientific
Polymerasa Dream Taq Green Master Mix	Thermo Scientific
Polymerasa Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	NewEngland BioLabs
T4 DNA ligasa	Thermo Scientific
TEV proteasa	připravena v laboratoři

3.2.3 Primery

Forwardní primer: 5' AAAAACCATGGATAAAAATGAGCTGGTTCA 3'

Reversní primer: 5' ATAAAGCGGCCGCTTACGATGTCCACAATGTCAAGT 3'

T7 primer: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

pHIS primer: 5' CCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGC 3'

Všechny použité primery byly připraveny firmou Integrated DNA Technologies.

3.3 Bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> DH5α	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 star	Life Technologies

4 METODY

4.1 Příprava vektoru pro bakteriální expresi 14-3-3 ζ

4.1.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Reakční směs pro amplifikaci DNA byla připravena dle tab. 3.1, celkový objem reakce byl 20 μ l. Reakce probíhala v automatizovaném termocykléru Professional TRIO

Thermocycler dle tab. 4.2. Sekvence forwardního primeru byla

AAAAACCATGGATAAAAATGAGCTGGTTCA, reversního primeru

ATAAAGCGGCCGCTTACGATGTCCACAATGTCAAGT.

Tab.4.1 Složení reakční směsi PCR

Složky	Množství
Templátová DNA (1000x 14-3-3 ζ)	2,4 ng
Forwardní primer 10 μ M	1 μ l
Reversní primer 10 μ M	1 μ l
Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	10 μ l

Tab. 4.2 Program PCR reakce

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]
1	98	30
35	98	10
	54	30
	72	30
1	72	120
1	4	∞

Produkt PCR reakce byl analyzován pomocí horizontální agarosové elektroforesy, viz kap. 4.1.2, str. 35, a přečištěn za použití komerční soupravy QIAquick PCR Purification kit dle návodu výrobce [61].

4.1.2 Horizontální agarosová elektroforesa

Na 1% agarosový gel obsahující 0,02% ethidium bromid byly naneseny 2 µl standardu Gene ruler a 2 µl vzorku (nezávisle na koncentraci DNA) smíchaného s 1 µl nanášecího pufru (DNA Loading Dye). Elektroforesa probíhala v horizontálním uspořádání 18 minut při napětí 300 V v TAE pufru. Separovaný vzorek DNA byl zviditelněn pomocí UV fotoaparátu QUANTUM ST4-1100.

4.1.3 Amplifikace vektorové DNA

25 µl chemicky kompetentních buněk *E.coli* DH5α bylo transformováno 1 µl plasmidu pHIS2 o koncentraci 139 ng/µl. Po transformaci byly buňky přeneseny do 5 ml LB media s přidavkem ampicilinu o finální koncentraci 100 µg/ml a inkubovány v rotačním inkubátoru Innova při 37°C a otáčkách 220 RPM přibližně 14 hodin. Plasmidová DNA byla izolována pomocí komerční soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit dle návodu výrobce [62].

4.1.4 Štěpení plasmidu a produktu PCR restrikčními endonukleasami

Plasmid i produkt PCR byly štěpeny stejnými restrikčními endonukleasami v celkovém objemu reakce 100 µl, v případě štěpení plasmidu byla do reakce přidána i CIAP (telecí alkalická fosfatasa). Reakční směsi připravené dle tab. 4.3 byly inkubovány 30 minut při teplotě 37°C. Štěpený plasmid a PCR produkt byly dále přečištěny za použití soupravy QIAquick PCR Purification kit [61].

Tab.4.3 Složení reakčních směsí pro restrikční štěpení DNA

Složky	Štěpení plasmidu	Štěpení produktu PCR
DNA	530 ng	2,08 µg
Endonukleasa NcoI	0,5 µl	0,5 µl
Endonukleasa NotI	0,5 µl	0,5 µl
CIAP	0,5 µl	-
Pufr Fast Digest Green	10 µl	10 µl
HPLC H2O	63,5 µl	39 µl

CIAP - telecí alkalická fosfatasa

4.1.5 Ligace

Pro vložení PCR produktu do linearizovaného plasmidu byla připravena ligační reakce dle tab. 4.4. Směs byla promíchána, odstředěna (30 sekund, 14 000 RPM, centrifuga eppendorf Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11) a inkubována 30 minut při 37°C .

Tab.4.4 Složení ligační směsi

Složky	Množství
Štěpený produkt PCR	5,5 µl
Štěpený plasmid	0,7 µl
ligační pufr (5x Rapid Ligation pufr)	3 µl
HPLC H ₂ O	5,5 µl
T4 DNA ligasa	0,3 µl
Celkový objem	15 µl

4.1.6 Transformace kompetentních buněk *E.coli* DH5α

K 60 µl buněčné suspenze chemicky kompetentních *E.coli* DH5α byly na ledu (cca 4°C) přidány 3 µl ligační směsi z kapitoly 4.1.5. Po 15 minutové inkubaci na ledu byly buňky podrobeny teplotnímu šoku 42°C po dobu 42 sekund. Následovala inkubace 10 minut na ledu. Po inkubaci byl k směsi přidán 1 ml LB media a buňky byly kultivovány při 37°C po dobu 1 hodiny. Směs byla odstředěna (30 sekund, 14 000 RPM, centrifuga Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-11). Většina supernatantu byla odstraněna, ve zbývajících 150 µl byla resuspendována peleta a za aseptických podmínek přenesena na Petriho misku s LB agarem (finální koncentrace Ampicilinu 100 µg/ml). Následovala inkubace přibližně 12 hodin při 37°C v převrácené poloze.

4.1.7 PCR z kolonií a následná minipreparace DNA

Bylo připraveno pět PCR reakcí dle tab. 4.5, str. 37. Do těchto směsí byla špičkou automatické pipety resuspendována část biomasy testovaných kolonií narostlých přes noc (viz kap. 3.1.6). PCR reakce proběhly v termocykléru Professional TRIO Thermocycler podle programu uvedeného v tab. 4.6, str. 37. Produkty byly separovány a vizualizovány pomocí agarosové elektroforesy v přítomnosti ethidium bromidu, viz kap. 4.1.2, str. 35.

Následujícím krokem byla minipreparace DNA. Kolonie které vykazovaly na svém elektroforetickém profilu PCR reakční směsi existenci produktu o velikosti vkládaného úseku DNA do plasmidu, byly inokulovány do 5 ml LB media (finální koncentrace Ampicilinu 100 µg/ml). Kultura byla za třepání inkubována 15 hodin při 37°C a otáčkách 220 RPM. Plasmidová DNA byla izolována pomocí soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit [62].

Tab.4.5 Složení reakce pro PCR z bakteriálních kolonií

Složky	Množství
biomasa z 1 kolonie	-
Forwardní primer T7 10µM	0,5 µl
Reverzní primer NotI 10µM	0,5 µl
Dream Taq Green Master Mix, Thermo Scientific	7,5 µl
HPLC H ₂ O	6,5 µl

Tab. 4.6 Program pro PCR z kolonií

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]
1	94	120
25	94	60
	52	30
	72	30
1	4	∞

4.1.8 Sekvenace

Byly připraveny dvě sekvenační reakce. V obou případech bylo smícháno 535 ng plasmidové DNA s vloženým insertem s 2,5 µl 10µM sekvenačního primeru. V první reakci byl sekvenačním primerem forwardní T7 primer, v reakci druhé reverzní pHIS primer. Takto připravené vzorky byly sekvenovány Sangerovou metodou firmou GATC Biotech.

4.2 Exprese a purifikace rekombinantního 14-3-3ζ

4.2.1 Exprese rekombinantního proteinu v buňkách *E.coli* BL21 star

Chemicky kompetentní buňky bakteriálního kmene *E.coli* BL21 star byly transformovány expresním vektorem o koncentraci 71,3 ng/μl metodou teplotního šoku. Při transformaci bylo postupováno stejně jako při transformaci buněk *E.coli* DH5α popsané v kapitole 4.1.6, str. 36. Buňky z jedné kolonie vyrostlé na LB agaru byly zaočkovány a inkubovány přibližně 14 hodin při 37°C a třepání při otáčkách 220 RPM v 5 ml LB media s ampicilinem v koncentraci 100 μg/ml. Takto připravenou bakteriální kulturou byly inokulovány 3 l autoindukčního ZY media s ampicilinem (finální koncentrace 100 μg/ml) v množství 1,6 ml kultury na litr ZY media. Kultury byly inkubovány při teplotě 37°C a otáčkách 220 RPM, po 5 hodinách byla teplota snížena na 24°C a buňky byly kultivovány dalších 14 hodin.

4.2.2 Purifikace proteinu

4.2.2.1 Centrifugace a lyse buněk

Bakteriální kultura připravená dle kap. 4.2.1 byla sklizena s využitím centrifugy Sorvall Evolution RC. Centrifugace probíhala 6 minut při 6000 RPM a 4°C v rotoru SLC-6000. Peleta byla resuspendována v přibližně 100 ml vychlazeného promývacího pufru a zhomogenizována na ledu (cca 4°C) za pomoci homogenizátoru podle Dounceho. Lyse buněk probíhala v EmulsiFlexu C3 za tlaku o velikosti 100-110 MPa. Lysát byl odstředěn na centrifuze Beckmann Coulter–Avanti Centrifuge J30I (15 minut při 15000 RPM, rotor JLA-16.250).

4.2.2.2 Afinity (chelatační) chromatografie na imobilizovaných iontech kovů

Exprimovaný protein obsahující afinitní značku složenou ze šesti histidinů byl ze supernatantu (kap. 4.2.2.1) izolován pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů. Těmito ionty byly nikelnaté ionty chelátované na NTA-agarose (NTA-agarosa obsahuje nitrilotrioctovou kyselinu vázanou na agarosové matici, jež s ionty přechodných kovů vytváří cheláty). Na nikelnaté ionty se koordinačně-kovalentní vazbou váže histidinová kotva proteinu skze volné elektronové páry dusíku imidazolu histidinových zbytků.

Ni-agarosa byla promyta vodou v čistotě pro HPLC, ekvilibrována promývacím pufrům a poté byla v několika ml promývacího pufru resuspendována a přidána k supernatantu. Po hodinové inkubaci na rotátoru při 8 RPM a 15°C byl supernatant s Ni-agarosou odstředěn (centrifuga Beckmann Coulter Allegra X-15R, 1 minuta, 1620 RPM). Supernatant byl odstraněn a k Ni-agarose bylo přidáno 40 ml promývacího pufru. Suspenze byla centrifugována (centrifuga Beckmann Coulter Allegra X-15R, 1 minuta, 1620 RPM). Takto byla Ni-agarosa promyta pětkrát. Pot byl nosič Ni-agarosy s navázaným proteinem přenesen do kolony o celkovém objemu 15 ml. Vázaný protein byl eluován 10 ml elučního pufru v 10 frakcích o objemu 1 ml, přítomnost proteinu ve frakcích byla analyzována pomocí SDS elektroforesy, viz kap. 4.2.2.3. Frakce, kde byla přítomnost proteinu potvrzena, byly spojeny. K roztoku izolovaného proteinu byla přidána EDTA (finální koncentrace 1 mM). Z roztoku bylo odebráno 300 µl pro pozdější elektroforetickou kontrolu štěpení proteinu TEV proteasou (kapitola 4.2.2.4), ke zbytku byl přidán merkaptoethanol na finální koncentraci 7 mM.

4.2.2.3 Diskontinuální elektroforesa v prostředí SDS (SDS-PAGE)

Vzorky pro elektroforetickou separaci byly připraveny smícháním 15 µl proteinového vzorku (14-3-3ζ byl desetkrát zředěn) s 5 µl 4x koncentrovaného redukujícího nanášecího pufru (Roti Load 1). Takto připravené vzorky a 2 µl standardu (Page ruler) byly nanášeny na polyakrylamidový gel připravený z 15% separačního a 4% zaostřovacího gelu, složení gelu viz tab. 4.7. Elektroforesa probíhala 30 minut při napětí 220 V ve vertikálním uspořádání. Jako elektroforetický pufr byl použit Tris-glycinový pufr obsahující 0,1% SDS. Separované proteiny byly vizualizovány 10 min. barvením polyakrylamidového gelu v CBB (Comassie Brilliant Blue) barvicím roztoku a jeho následným odbarvením v destilované vodě.

Tab. 4.7 Složení polyakrylamidového gelu

	Zaostřovací gel	Separací gel
Tris-Cl	125 mM (pH 6,8)	375 mM (pH 8,8)
Akrylamid/bisakrylamid (37,5 : 1)	4 % (V/V)	15 % (V/V)
SDS	0,1 % (W/V)	0,1 % (W/V)
TEMED	0,005 % (V/V)	0,001 % (V/V)
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0,05 % (W/V)	0,05 % (W/V)

4.2.2.4 Štěpení TEV proteasou

Histidinová kotva proteinu byla odstraněna enzymaticky přidáním 300 μ l TEV proteasy o koncentraci 2 mg/ml. Štěpení probíhalo při 4°C 6 dní. Proces štěpení byl kontrolován elektroforeticky.

4.2.2.5 Koncentrování proteinu

Roztok proteinu byl koncentrován pomocí koncentrátoru Amicon Ultra s celulosovou membránou propouštějící molekuly do velikosti 30 kDa. Koncentrátor byl s proteinovým roztokem centrifugován na centrifuze Beckmann Coulter – Allegra X-15 R při 3000 RPM, dokud nebyl objem roztoku přibližně 500 μ l.

4.2.2.6 Gelová permeační chromatografie

Protein byl přečištěn pomocí gelové permeační chromatografie, kdy se molekuly rozdělují na základě své velikosti. HPLC systém AKTA purifier byl promyt HPLC H₂O. Poté byla připojena kolona Superdex 200 10/300 GL, promyta 25 ml HPLC H₂O za průtoku 0,5 ml/minutu a tlakovým maximem 1MPa a ekvilibrována pufrem pro gelovou permeační chromatografii. Na ekvilibrovanou kolonu bylo skrze 0,5 ml smyčku nanášeno 500 μ l roztoku koncentrovaného proteinu (viz kap. 4.2.2.5). Frakce byly spektrofotometricky analyzovány při vlnových délkách 254 nm a 280 nm a jímány po 0,5 ml automatickým sběračem frakcí do 96-jamkové destičky typu „deep well“. Frakce, jejichž eluční profil odpovídal přítomnosti proteinů, byly analyzovány elektroforeticky. Ty, jež obsahovaly požadovaný protein v dostatečné čistotě, byly spojeny. Protein byl koncentrován na 37,9 mg/ml a uchováván při teplotě -80°C.

4.2.2.7 Stanovení koncentrace proteinu

Pomocí mikrospektrofotometru ND-1000 byla zjištěna absorbance roztoků 14-3-3 proteinu při vlnové délce 280 nm. Molární koncentrace byla vypočítána z Lambert Beerova zákona, extinkční koeficient byl zjištěn pomocí aplikace ProtParam portálu ExPASy.

4.3 Expres a purifikace 14-3-3 z *Lachancea thermotolerans*

Vektor pro bakteriální expresi 14-3-3 proteinu z kvasinky *Lachancea thermotolerans* (14-3-3 L.t.) již byl připraven dr. Evženem Bouřou. Při expresi i purifikaci proteinu bylo

postupováno stejně jako při expresi a purifikaci 14-3-3ζ. Po gelové permeační chromatografii, při které byla použita kolona Superdex 75 10/300 GL, byl protein koncentrován na koncentraci 5,42 mg/ml a dále uchováván při teplotě -80°C.

4.4 Rentgenová krystalografie

4.4.1 Krystalizace 14-3-3ζ v komplexu s peptidem PtdIns4KIIIβ

Komplex pro krystalizaci byl připraven smícháním proteinu 14-3-3ζ s přídavkem redukčního činidla TCEP o finální koncentraci 3 mM s peptidem PtdIns4KIIIβ v molárním poměru 1,4:1 na finální koncentraci 14-3-3ζ 0,35 mM.

Pro krystalizaci komplexu bylo využito komerčních sad krystalizačních roztoků, nejprve sad MIDAS, MORPHEUS, JCSG Core Suite I-IV a Proplex. Krystaly, jež vznikly v těchto roztocích však při mražení v kapalném dusíku praskaly. K další krystalizaci bylo proto využito roztoků s kryoprotektantem. Krystalizační roztoky CryoJCSG Core I, CryoJCSG Core III, CryoJCSG Core IV byly připraveny smícháním roztoků JCSG Core Suite s glycerolem v poměru 4:1, krystalizační roztok CryoProplex s ethylenglykolem ve stejném poměru. Dále byla použita sada sady Trinity připravená dr. Martinem Klímou.

Komplex byl krystalizován metodou difuze par v provedení sedící kapky za pomoci robota CrystalGryphon. Do šesti 96-ti jamkových krystalizačních destiček Intelli-plate byly napipetovány krystalizační roztoky v objemu 75 μl do jamek destičky pro rezervoár. Sedící kapka byla vytvořena smícháním 0,3 μl komplexu s krystalizačními roztoky v objemovém poměru 1:1 v jamkách nad rezervoáry. Po zaplnění všech jamek byla destička přelepena průhlednou fólií pro zabránění odchodu par a oddělení krystalizačních experimentů. Krystalizační experimenty byly ponechány v teplotě 18°C a průběh krystalizace byl monitorován pomocí světelného mikroskopu Olympus SZX10. Vzniklé krystaly byly zamrazeny v kapalném dusíku.

4.4.2 Krystalizace 14-3-3 L.t. v komplexu peptidem PtdIns4KIIIβ

Protein 14-3-3 L.t byl smíchán s peptidem PtdIns4KIIIβ v molárním poměru 1:5,3 na jeho finální koncentraci 0,095 mM. Jako krystalizační roztoky byly použity roztoky komerčních sad JCSG I, JCSG III a Proplex, jež byly obohaceny o kryoprotektant (viz kapitulu 4.4.1). Sedící kapky byly vytvořeny v krystalizačních destičkách Intelli-plate robotem Oryx smícháním 0,22 μl komplexu a 0,22 μl krystalizačního roztoku. Krystalizace probíhala

v teplotě 18°C a její průběh byl kontrolován pomocí mikroskopu Olympus SZX10. Vytvořené krystaly byly zamraženy v kapalném dusíku.

4.4.3 Měření difrakce rentgenového záření

Difrakce krystalu komplexu 14-3-3ζ byla měřena dr. Evženem Bouřou v synchrotronu Diamond, krystal byl ozařován paprskem o vlnové délce 0,97625 Å. Difrakční data 14-3-3 L.t získal rovněž dr. Evžen Bouřa v synchrotronu BESSY za použití paprsku o vlnové délce 0,918409 Å. Obě měření probíhaly za chlazení krystalu na teplotu 100K.

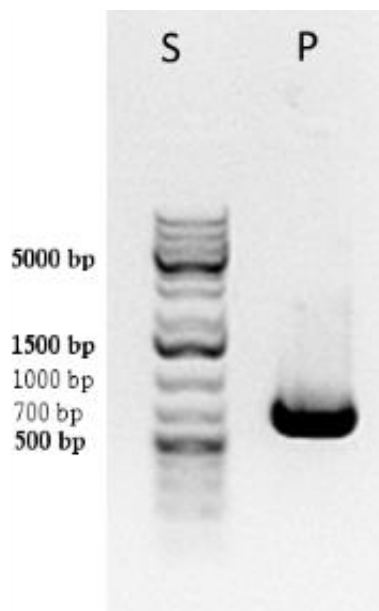
4.4.4 Vytvoření modelu struktury

Získaná difrakční data byla integrována dr. Evženem Bouřou v programu XDS [63]. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulového nahrazení v programu Phaser [64]. Pro stavbu modelu a tzv. „refinement“ (z angl. čištění) bylo využito programů Phenix [65] a Coot [66]. Následné grafické zpracování modelu bylo provedeno pomocí programu PyMol [67].

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava vektoru pro bakteriální expresi 14-3-3 ζ

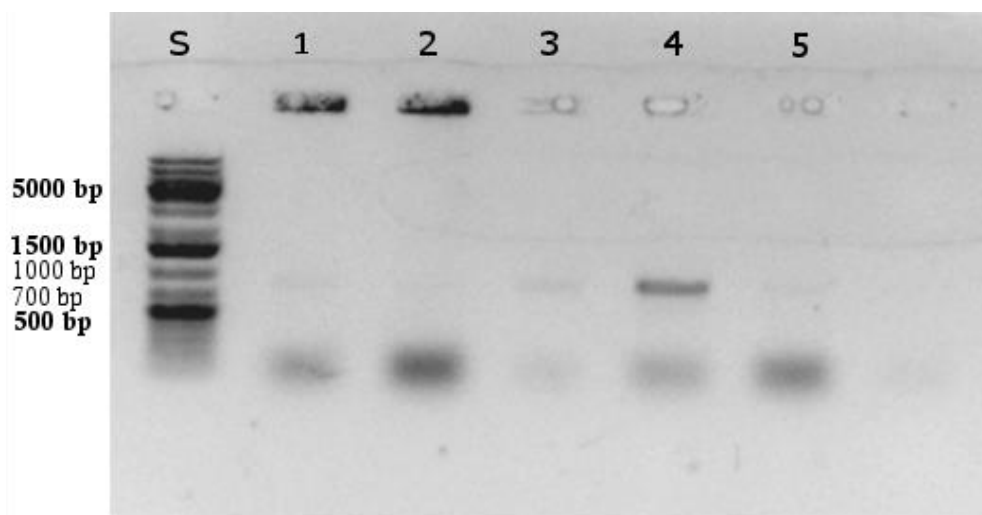
Byl navržen konstrukt pro 14-3-3 ζ kódující sekvenci Met1 až Ser230, jenž obsahoval artifciální stop kodon a restrikční místa pro endonukleasy NcoI a NotI. Konstrukt byl získán PCR reakcí z dostupného templátu (templátová DNA byl dar dr. Davida C. Kleina) za použití primerů uvedených v kap. 3.2.3, str. 33, pro podmínky a složení PCR reakce viz kapitolu 4.1.1, str. 34. Při PCR reakci byla templátová DNA amplifikována a obohacena o restrikční místa pro endonukleasy NcoI a NotI a stop kodon. Elektroforetická pohyblivost produktu PCR reakce odpovídala velikosti požadovaného konstrukt pro 14-3-3 protein (766 bp), viz obr 5.1. Produkt PCR reakce byl přečištěn pomocí komerční sady QIAquick PCR Purification kit [61].



Obr. 5.1: 1% agarosová elektroforesa PCR produktu v přítomnosti EtBr. S-standard, P-PCR produkt

Vektor pHis Parallel 2 byl amplifikován v buňkách *E.coli* DH5 α , viz kapitola 4.1.3., str.35. Tento plasmid obsahuje sekvence kódující kotvu šesti histidinů a štěpné místo pro TEV proteasu a je díky přítomnosti T7 promotoru vhodný pro bakteriální expresi pomocí T7 systému. Obsahuje také sekvenci kódující β -laktamasu zajišťující resistenci transformovaných bakterií na ampicilin.

Po následném restrikčním štěpení vektoru a produktu PCR reakce restrikčními endonukleasami NcoI a NotI (kapitola 4.1.4, str. 35) byla plasmidová i templátová DNA ligována (kap. 4.1.5, str. 36). Vektor nesoucí insert pro 14-3-3 protein byl transformací vnesen do buněk *E. coli* DH5 α , jež byly kultivovány na LB agaru s přidavkem ampicilinu (kap. 4.1.6, str. 36). Ze sedmi narostlých kolonií byla provedena PCR reakce (kap. 4.1.7, str. 36), při níž byl jako forwardní primer použit primer specifický pro vektor a reversním primerem byl primer specifický pro insert (konstrukt 14-3-3 proteinu). Produkty PCR z kolonií byly analyzovány pomocí agarosové elektroforesy, viz obr.5.2. Buňky z kolonie č. 4, jež byla identifikována jako pozitivní, byly přes noc kultivovány v LB mediu. Následně byla izolována jejich plasmidová DNA a firmou GATC Biotech byla provedena její sekvenace (viz kap. 4.1.8, str. 37).



Obr. 5.2: Agarosová elektroforeza produktů PCR z kolonií. V drahách zobrazeny elektroforetické pohyblivosti produktů kolonií 1-5.

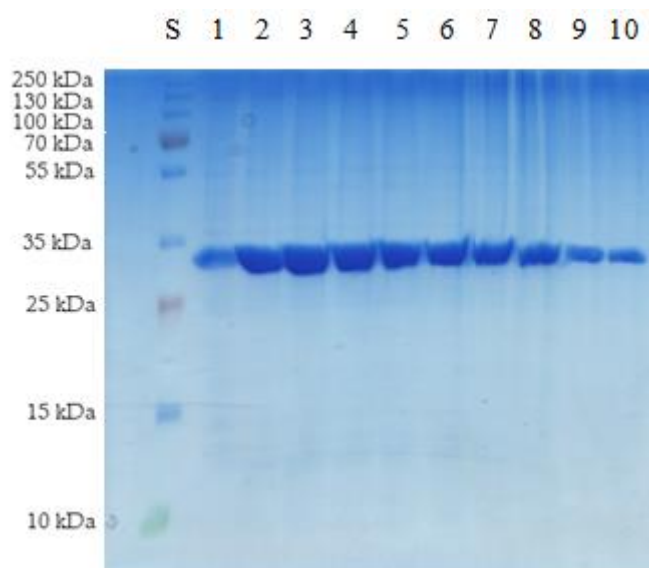
5.2 Exprese a purifikace 14-3-3 ζ a 14-3-3 *Lachanea thermotolerans*

Pro expresi obou proteinů byly využity bakterie *E.coli* BL21 star. Ty obsahují chromosomální kopii genu pro T7 RNA polymerasu, jež vysoce specificky nasedá na T7 promotor a jejíž exprese je regulována lac promotorem. Pro expresi 14-3-3 proteinu byly proto buňky kultivovány v autoindukčním mediu obsahující glukosu i laktosu.

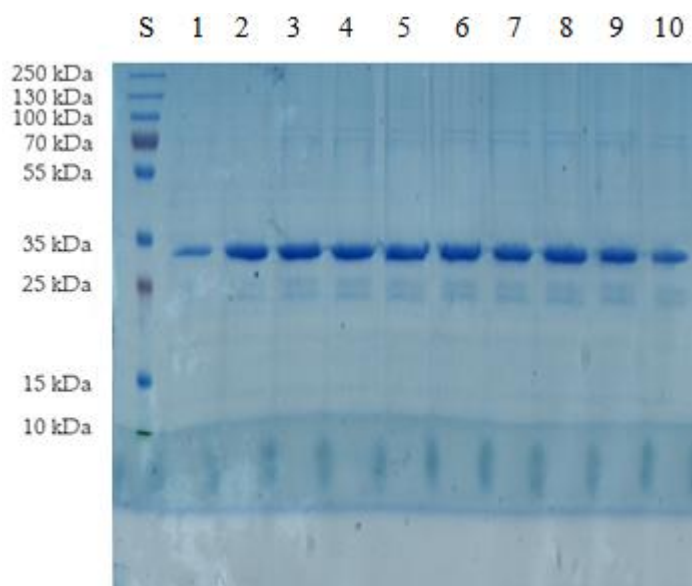
Buňky *E.coli* BL21 star byly nejprve transformovány vektorem pro expresi 14-3-3 ζ , jehož příprava je popsána výše a podrobněji v kapitole 4.1, či vektorem pro expresi 14-3-3 L.t., který již byl připraven dr. Evženem Bouřou. Transformované buňky byly kultivovány

v LB mediu a po inkubaci byla tato bakteriální kultura rozdělena do 3 litrů autoindukčního ZY media a dále kultivována, viz kap. 4.2.1, str. 38.

Purifikace 14-3-3 ζ i 14-3-3 L.t. probíhala stejným způsobem. Bakteriální kultura byla odstředěna, peleta resuspendována, homogenizována a buňky lysovány pomocí emulsiflexu, viz kap. 4.2.2.1, str. 38. Z uvolněného buněčného obsahu byl 14-3-3 protein obsahující „His-kotvu“ izolován pomocí afinitní chelatační chromatografie na nikelnatých iontech imobilizovaných na NTA-agarose (viz kap. 4.2.2.2, str. 38). Po vazbě proteinu na Ni-NTA agarosu vsádkovým způsobem byl nosič přenesen na ekvilibrovanou kolonu a kolona byla promývána pufrem s imidazolem o koncentraci 40 mM, aby došlo k snížení množství nespecificky vázaných proteinů. 14-3-3 protein byl eluován do deseti frakcí o objemu 1 ml pufrem se zvýšenou koncentrací imidazolu (300 mM), jenž kompetuje s histidiny His-kotvy v interakci na nikelnaté ionty. Eluční profil 14-3-3 ζ je zobrazen na obr. 5.3, 14-3-3 L.t. na obr. 5.4, str. 44. Elektroforetická pohyblivost izolovaného proteinu odpovídala 14-3-3 ζ respektive 14-3-3 L.t obohacenému o His-kotvu.

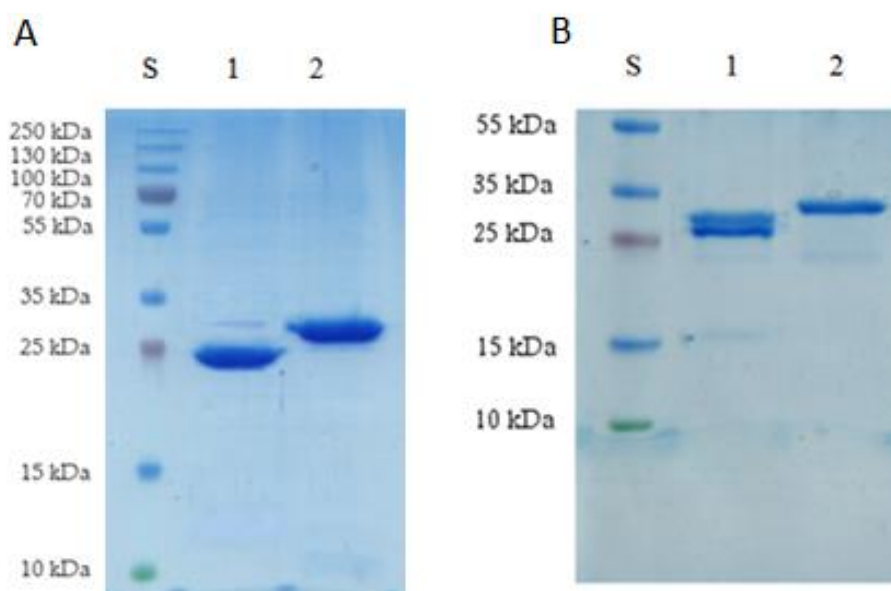


Obr 5.3: 15% polyakrylamidový gel SDS-PAGE barvený CBB R250 ilustrující eluční profil 14-3-3 ζ při afinitní chromatografii na imobilizovaných iontech kovu. S-standard, 1-10 – jednotlivé frakce



Obr. 5.4: 15% gel z SDS-PAGE barvený CBB R250 ilustrující eluční profil 14-3-3 L.t. při afinitní chromatografii na imobilizovaných iontech kovu. S – standard, 1-10 – jednotlivé frakce

Dále byla z 14-3-3 proteinů odstaněna His-kotva štěpením TEV proteasou (viz kap. 4.2.2.4, str. 40), pro kterou rekombinantní 14-3-3 protein obsahoval specifické štěpné místo. Štěpení bylo kontrolováno elektroforeticky (viz obr. 5.5), rozdíl v pohyblivostech štěpeného a neštěpeného proteinu odpovídal velikosti His-kotvy, jejíž hodnota byla v konstruktu 14-3-3ζ přibližně 3,2 kDa a v konstruktu 14-3-3 L.t. 2,2 kDa. Nečistota v první linii na obr. 5.5B by mohla odpovídat TEV protease, jejíž velikost je přibližně 25 kDa.

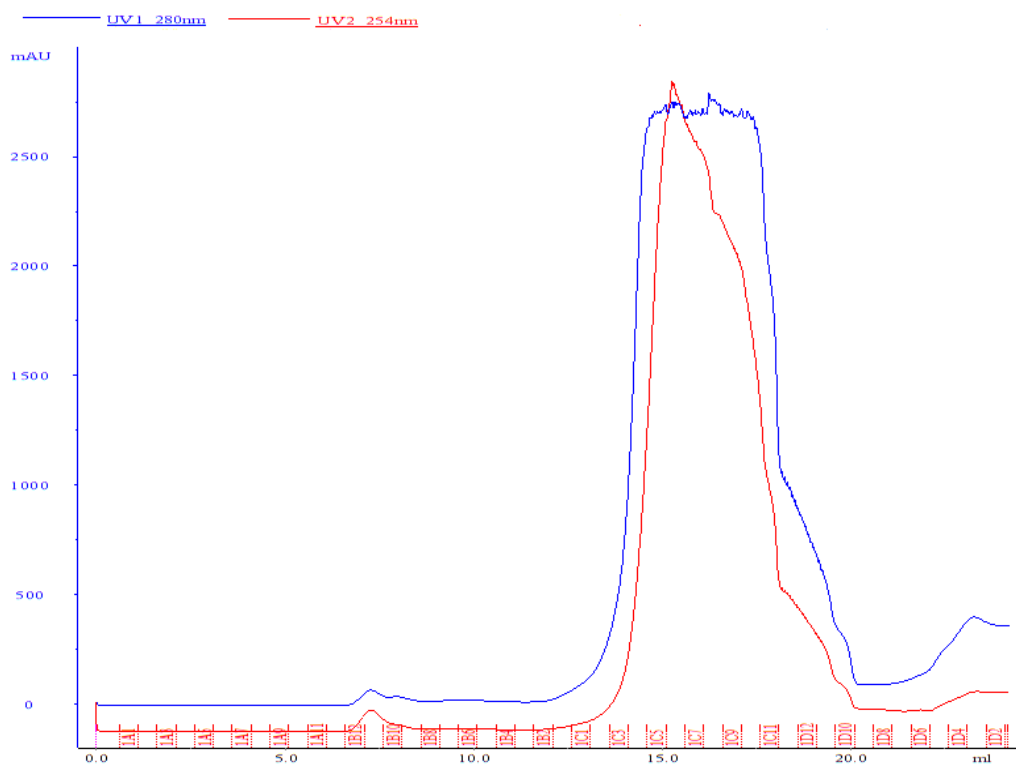


Obr. 5.5: 15% gel z SDS-PAGE barvený CBB R250 ilustrující štěpení 14-3-3ζ s His-kotvou Tev proteasou. A) Štěpení 14-3-3ζ. S – standard, 1 – štěpený 14-3-3ζ, 2 – neštěpený 14-3-3ζ.

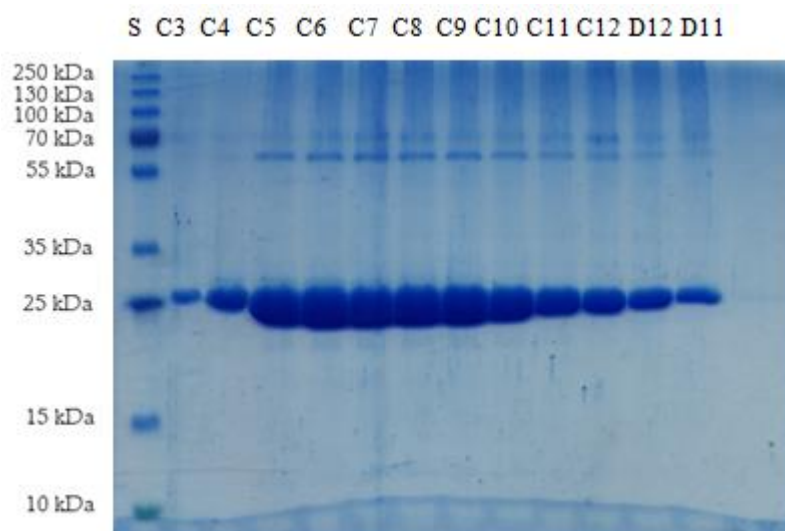
B) Štěpení 14-3-3 L.t. S – standard, 1 – štěpený 14-3-3 L.t., 2 – neštěpený 14-3-3 L.t.

Pro odstranění nečistot z roztoku 14-3-3 proteinu byl 14-3-3 protein nejprve koncentrován (viz kap. 4.2.2.5, str. 40) a dále purifikován pomocí gelové permeační chromatografie za použití kolony Superdex 200 10/300 GL (14-3-3 ζ) nebo Superdex 75 10/300 GL (14-3-3 L.t.) (viz kap. 4.2.2.6, str. 40). Na obr. 5.6 a 5.8, str. 48, je zobrazen eluční profil 14-3-3 ζ a 14-3-3 L.t. Frakce, jež vykazovaly největší hodnoty absorbance, byly elektroforeticky analyzovány, viz obr. 5.7, str. 48 a obr. 5.9, str. 48. Frakce 14-3-3 ζ C3-C10 a frakce 14-3-3 L.t. B9-B7 byly spojeny.

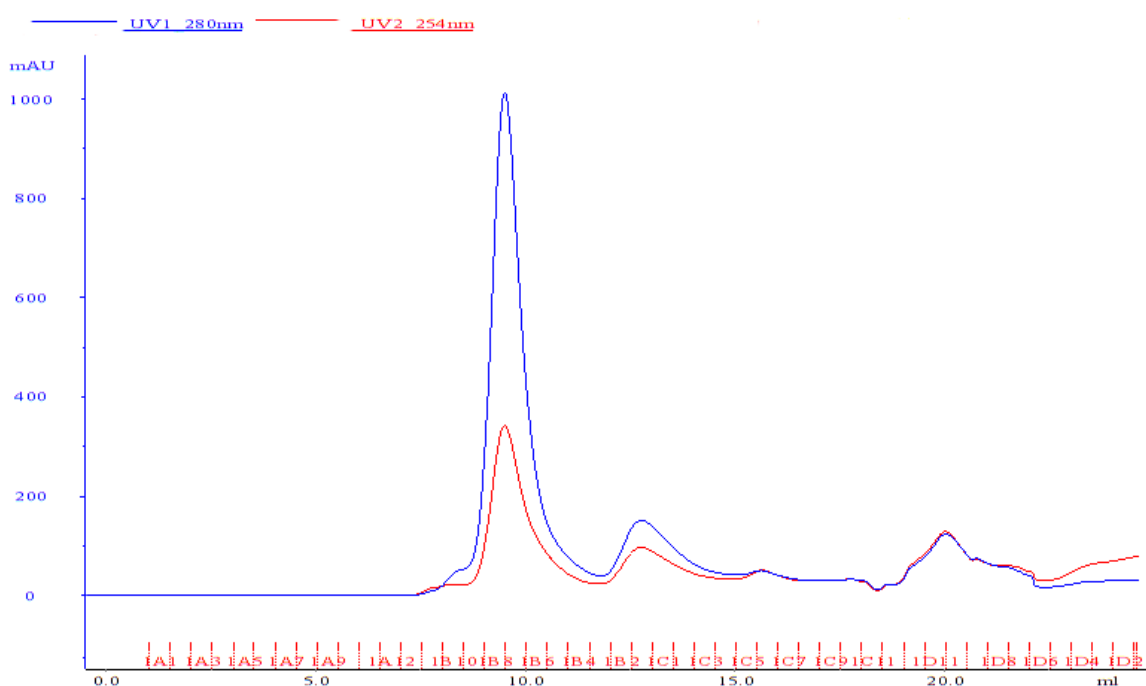
14-3-3 ζ byl zkoncentrován na koncentraci 37,9 mg/ml a 14-3-3 L.t. na 5,42 mg/ml. Proteiny byly uchovávány v -80°C. Celkově bylo získáno 600 μ l proteinu 14-3-3 ζ o koncentraci 37,9 mg/ml a 88 μ l 14-3-3 L.t. o koncentraci 5,42 mg/ml.



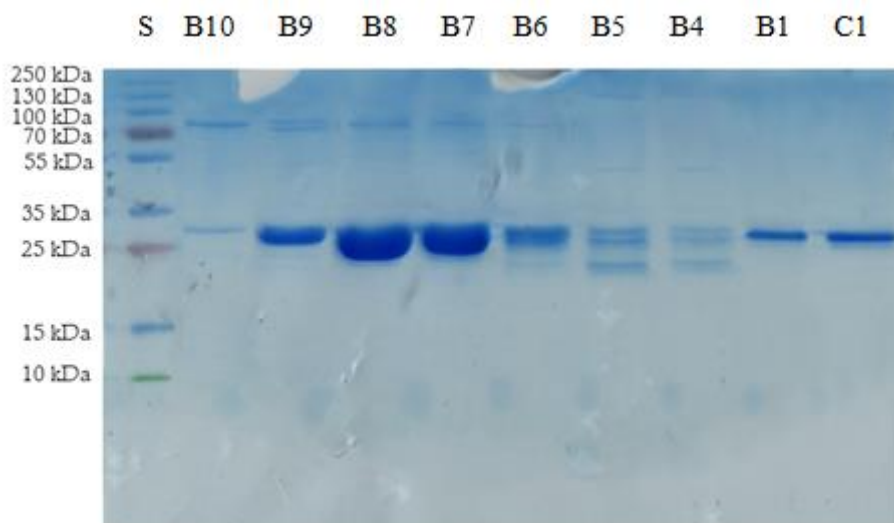
Obr. 5.6: Eluční profil 14-3-3 ζ při gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 200 100/300 GL.



Obr. 5.7: Elektroforetická kontrola frakcí s nejvyšší absorbcí při 280 nm získaných při gelové permeační chromatografii 14-3-3ζ. Použit byl 15% polyakrylamidový gel, gel byl barven CBBR250. C3-D11 – frakce získané při gelové permeační chromatografii 14-3-3ζ, viz. obr. 5.6, str. 47.



Obr. 5.8: Eluční profil 14-3-3 L.t. při gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 75 100/300 GL.



Obr. 5.9: *Elektroforetická kontrola frakcí s nejvyšší absorbcí při 280 nm získaných při gelové permeační chromatografii 14-3-3 L.t*. Použit byl 15% akrylamidový gel, gel byl barven CBBR250. B10-C1 – frakce 14-3-3 L.t získané při gelové permeační chromatografii, viz. obr. 5.8, str. 58.

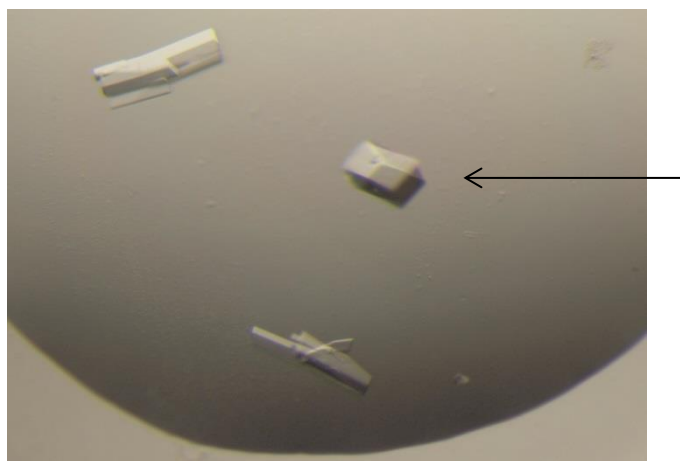
5.3 Krystalizace 14-3-3 proteinu a rentgenová krystalografie

Komplexy pro krystalizaci byly získány smícháním 14-3-3 ζ s peptidem PtdIns4KIII β v molárním poměru 1,4:1 na finální koncentraci 14-3-3 ζ 0,35 mM a 14-3-3 L.t s týmž peptidem v molárním poměru 1:5,3 na výslednou koncentraci 0,095 mM, viz kap. 4.4.1, str. 41 a 4.4.2, str. 42.

Krystalizace probíhala metodou difuze par v uspořádání sedící kapky. Pro krystalizaci komplexu 14-3-3 ζ byly nejprve použity roztoky komerčních sad MIDAS, MORPHEUS, JCSG Core Suite I-IV a Proplex, avšak krystaly, jež se vytvořily, při mražení v tekutém dusíku praskaly. Proto byl 14-3-3 ζ krystalizován znovu za použití roztoků JCSG Core Suite I, JCSG Core Suite III, JCSG Core Suite IV a Proplex s kryoprotektantem (viz kap. 4.4.1, str. 41). Dále byla použita sada Trinity, jež byla připravena dr. Martinem Klímou. Krystalizace 14-3-3 L.t probíhala v roztocích sad JCSG I s 20% glycerolem, JCSG III s 20% glycerolem a Proplex.

Krystaly rostly při teplotě 18°C přibližně 5 dní a vykazovaly dostatečnou velikost a kvalitu, krystalizační podmínky se tak nemusely optimalizovat. Pro měření difrakce rentgenového záření byl vybrány krystaly, jež se vytvořily v následujících podmínkách:

- *krystal 14-3-3ζ v komplexu s PtdIns4K IIIβ* (viz obr. 5.10, str. 50): 0,1 M MES (2-(Nmorpholino)ethanesulfonová kyselina), pH 6,0, 10% (W/V) polyethylenglykol 8000, 20% (V/V) ethylenglykol
- *krystal 14-3-3 L.t. v komplexu s PtdIns4K IIIβ*: 0,2M acetát hořečnatý, 20% (W/V) polyethylenglykol 3350, 20% (V/V) glycerol



Obr. 5.10: *Krystal komplexu 14-3-3ζ s peptidem PtdIns4KIIIβ použitý při měření difrakce. Krystal se vytvořil v podmínkách 0,1 M MES (2-(Nmorpholino)ethanesulfonová kyselina) pH 6,0, 10% (W/V) polyethylenglykol 8000, 20% (V/V) ethylenglykol.*

Měření difrakce rentgenového záření krystalu komplexního 14-3-3ζ a 14-3-3 L.t. a zpracování získaných dat bylo provedeno dr. Evženem Bouřou, viz kap. 4.4.3, str. 42 a 4.4.4, str. 42. Fázový problém byl u obou modelů vyřešen metodou molekulového nahrazení. Krystal komplexu 14-3-3ζ poskytoval maximální rozlišení 2,08 Å v prostorové grupě P21 21 21, krystal komplexního 14-3-3 L.t 2.789 Å v prostorové grupě P21 21 2. Statistické vyhodnocení sběru dat a modelů struktur jsou uvedeny v tab. 5.1, str. 51.

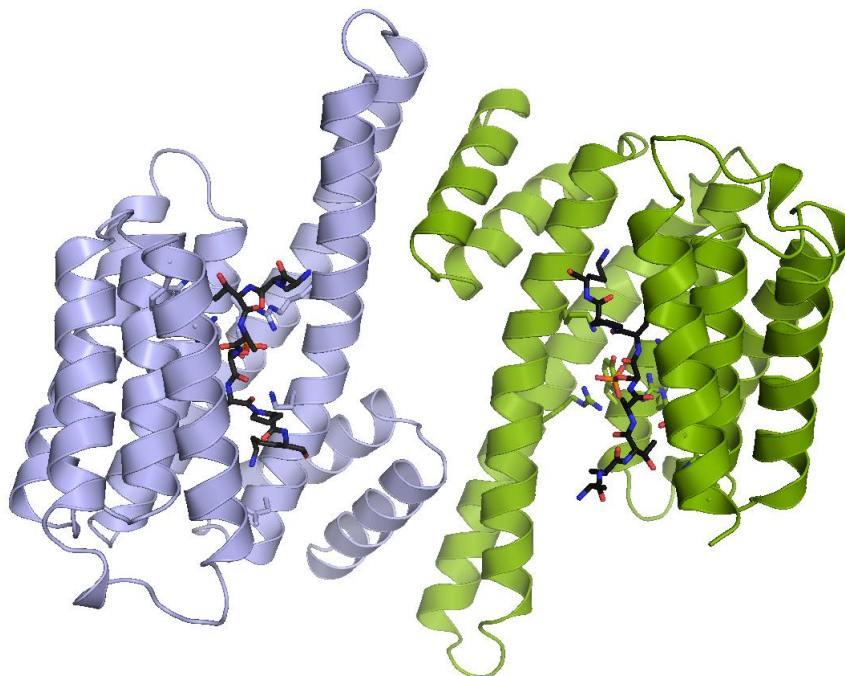
Tab. 5.1 Statistika sběru dat a vyhodnocení modelů struktur komplexu 14-3-3ζ a 14-3-3 L.t.

	14-3-3ζ	14-3-3 L.t.
Vlnová délka záření (Å)	0,97625	0,91841
Rozpětí rozlišení (Å)	48,94 - 2,08 (2,154 - 2,08)	44,51-2,79 (2.889 - 2.789)
Prostorová grupa	P 21 21 21	P 21 21 2
Rozměry elementární buňky	a = 71,82 Å, b = 83,55 Å, c = 111,53 Å	a = 64,09 Å, b = 123,72 Å, c = 38,702 Å
Počet celkových reflexí	62955	31092
Počet jedinečných reflexí	41025 (4035)	7994 (759)
Multiplicita	7,35	3,89
Kompletnost (%)	99,99 (100,00)	98,23 (98,70)
I/sigma(I)	19,25 (2,60)	8.10 (2,48)
R-merge	9,1 %	13,3 %
R-work	18,79 % (26,60 %)	18,93 % (26,01 %)
R-free	23,11 % (31,02 %)	25,01 % (27,38 %)
Počet nevodíkových atomů	2019	1885
Makromolekuly	1839	1835
Ligandu	56	37
Vody	119	13
Počet zbytků proteinu	230	230
Počet zbytků ligandu	8	5
RMS(vazby)	0,008	0,009
RMS(úhly)	0,95	1,09
Ramachandran (outliers/favored)	0/99	0/98,25*
Průměrný B-faktor	47,60	42,00
Makromolekuly	47,30	41.60
Ligandu	50,00	59.50
Solventu	50,90	46,20

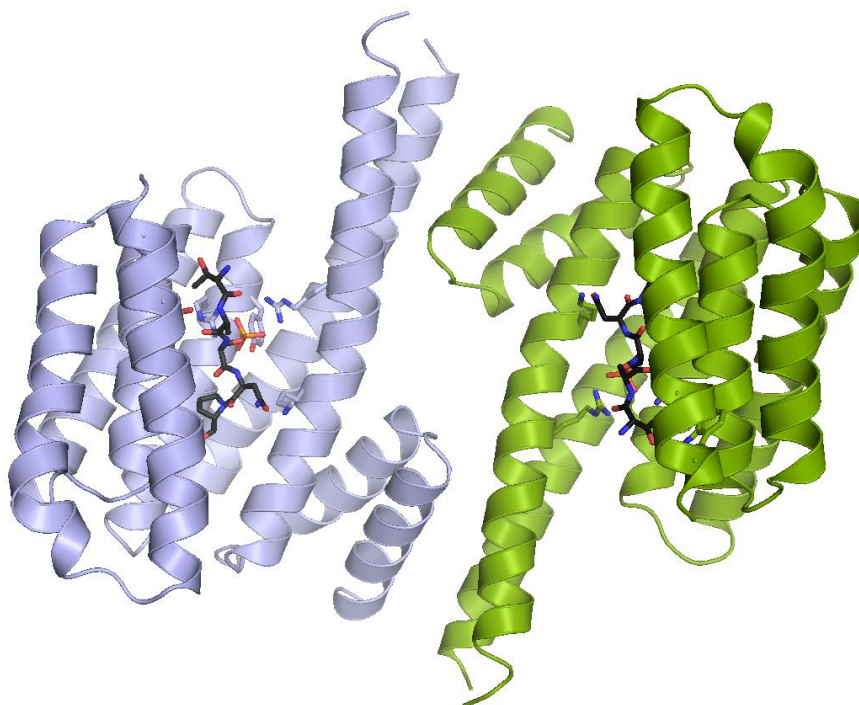
Hodnoty v závorkách odpovídají hodnotám pro slupku v nejvyšším rozlišení.

* hodnota vypočtena programem Coot [66]

Obrázky modelů struktury byly vytvořeny v programu PyMol [67]. Vytvořené modely, zobrazeny na obr. 5.11 a 5.12, odpovídají typické vysoce helikální struktuře 14-3-3 proteinů tvořené devíti antiparalelními α helixy lemujícími vazebný žlábek. Detailněji je struktura 14-3-3 proteinů popsána v kapitole 1.2.4, str. 18.



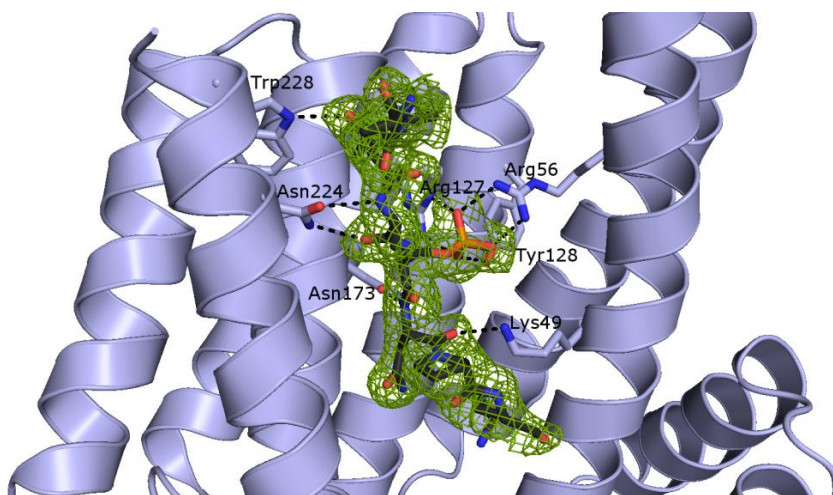
Obr. 5.11: Model struktury dimerního 14-3-3 ζ v komplexu s fosfopeptidem PtdIns4KIII β .



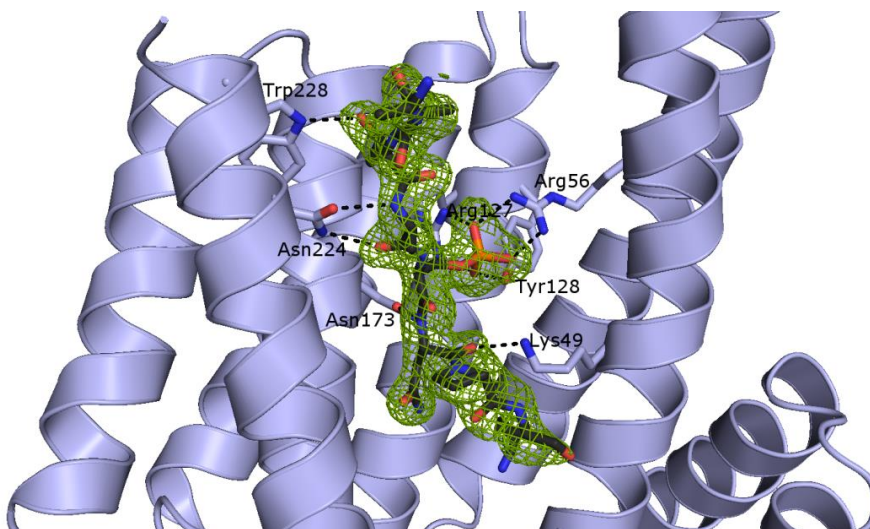
Obr. 5.12: Model struktury dimerního 14-3-L.t v komplexu s fosfopeptidem PtdIns4KIII β .

Peptid odvozený od PtdIns4KIII β o sekvenci ²⁸⁹LKRTASNPKV²⁹⁸ (číslování aminokyselinových zbytků vychází ze sekvence s identifikačním číslem uniprot Q9UBF8-1) s fosforylovaným serinem pSer298 se nacházel ve vazebném žlábků 14-3-3 proteinu, vázán jak interakcemi s fosfátovou skupinou peptidu, tak i s jeho páteří.

V proteinu 14-3-3 ζ se na vazbě fosfátové skupiny podílely potranní řetězce Arg 56, Arg127 a Tyr128, viz obr. 5.13 a obr. 5.14. Zatímco interakce mezi zbytky argininů a fosfátem pSer294 peptidu byly zprostředkovány solnými můstky, hydroxylová skupina tyrosinu vytvářela s fosfátem vodíkovou vazbu. Dále byl peptid stabilizován nekovalentními interakcemi Lys49 a Asn173 14-3-3 ζ s Asn295 peptidu, Asn224 14-3-3 ζ s Ala293 peptidu a mezi Trp228 14-3-3 ζ a Thr292 peptidu, viz obr. 5.13 a obr. 5.14.

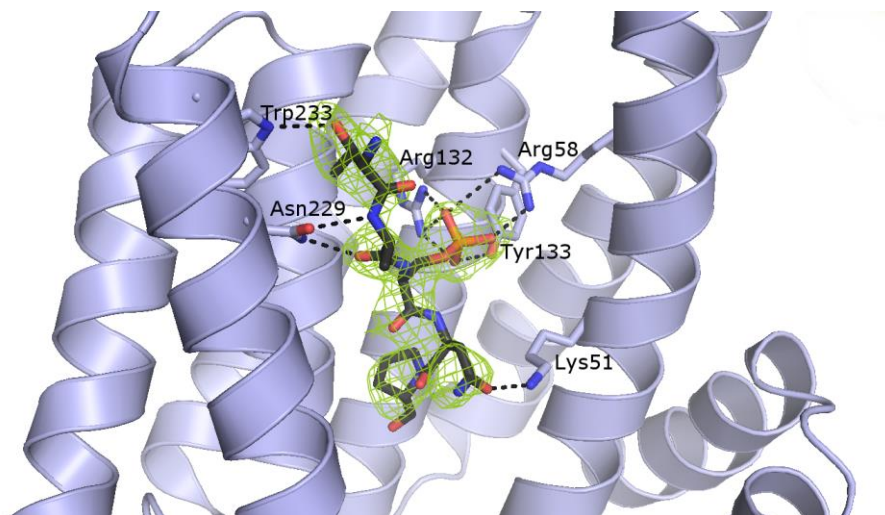


Obr 5.13: Detail interakce 14-3-3 ζ s fosfopeptidem PtdIns4K III β . Zeleně znázorněna diferenciální mapa elektronové hustoty při 2 σ .

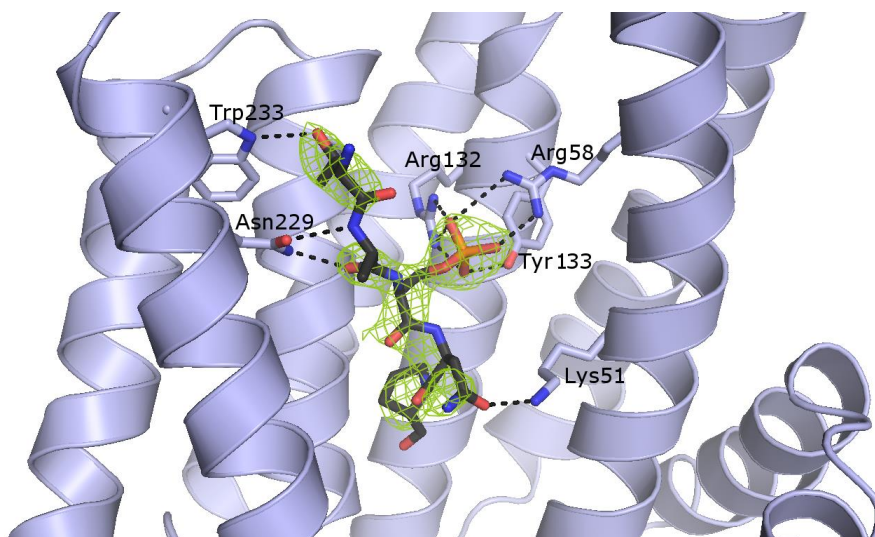


Obr 5.14: Detail interakce 14-3-3 ζ s fosfopeptidem PtdIns4K III β . Zeleně znázorněna diferenciální mapa elektronové hustoty při 3 σ .

Vazba 14-3-3 proteinu kvasinky *Lachancea thermotolerans* s peptidem PtdIns4KIII β byla zprostředkována postranními řetězci Arg58, Arg132 a Tyr133 interagujícími s fosfátovou skupinou pSer294 peptidu. Dále byly indentifikovány vodíkové můstky mezi Lys51 14-3-3 L.t a Asn295 peptidu, Asn229 14-3-3 L.t a Ala293 peptidu a Trp233 14-3-3 L.t a Thr292 peptidu. Detail modelu s vyznačenými nekovalentními interakcemi je znázorněn na obr. 5.15 a 5.16.



Obr.5.15: Detail interakce 14-3-3 L.t s fosfopeptidem PtdIns4K III β . Zeleně znázorněna diferenciální mapa elektronové hustoty při 2σ .



Obr.5.16: Detail interakce 14-3-3 L.t s fosfopeptidem PtdIns4K III β . Zeleně znázorněna diferenciální mapa elektronové hustoty při 3σ .

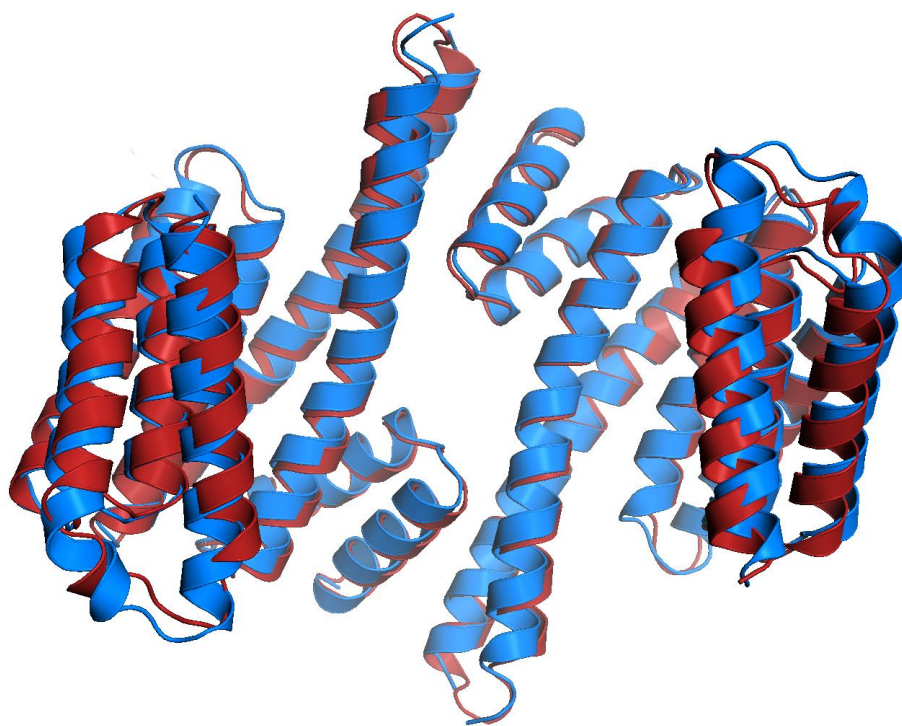
6 DISKUZE

Z porovnání primární struktury 14-3-3ζ a 14-3-3 L.t., které je zobrazeno na obr. 6.1, vyplývá, že primární sekvence mají 65% identitu s největšími rozdíly v oblastech odpovídajících β-otáčkám. Tato sekvenční podobnost se odráží i ve struktuře proteinů, jež vykazují vysokou podobnost, jak je vidět na obr. 6.2, str. 56. Tomu odpovídá i odchylka struktury proteinů vyjádřená pomocí hodnoty RMS (z angl. root mean square) 2,4 Å.

14-3-3ζ	--MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELSNEERNLLSVAY	48
14-3-3 L.t	MSQSREDSVYLAKLAEQAERYEEMVDSMKAVASSGQELSVEERNLLSVAY	50
14-3-3ζ	KNVVGARSSWRVVSIEQKTEG---AEKKQQMAREYREKIETELRDICN	95
14-3-3 L.t	KNVIGARASWRIVVSIEQKEEAKDKSEHQVKLIRDYRSKIETELTKICD	100
14-3-3ζ	DVLSLLEKFLIPNASQA ESKVFYILKMKGDYYRYLAEVAAGDDKKGIVDQS	145
14-3-3 L.t	DILSVLDTHLIPSATTG ESKVFYIKMKGDYHRYLAEFSSGEVRDKATNAS	150
14-3-3ζ	QQAYQEAFEISKKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTA	195
14-3-3 L.t	LEAYKTASEIATTELPPTHPIRLGLALNFSVFYYEIQNSPDKACHLAKQA	200
14-3-3ζ	FDEAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDT--QG-DEAEAGEG	242
14-3-3 L.t	FDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSMDMSEAGQDEQQPAEG	250
14-3-3ζ	GEN 245	
14-3-3 L.t	AQE 253	

Obr. 6.1: Porovnání primární struktury 14-3-3ζ a 14-3-3L.t. Černě znázorněny aminokyseliny konzervované, šedivě aminokyseliny podobné a nezvýrazněné jsou aminokyseliny různé. Červeně jsou zapsány aminokyselinové zbytky interagující s fosfátem fosfopeptidu a zeleně interagující s páteří fosfopeptidu. Pomlčky v sekvencích značí nepřítomnost aminokyseliny. Uniprot identifikační kód pro sekvenci 14-3-3ζ je P63104-1 a pro sekvenci 14-3-3 L.t. C5DN49-1. Srovnání sekvencí bylo provedeno pomocí nástroje ClustalW2 portálu EMBL (za použití výchozí nastavení) a zvýraznění pomocí nástroje Boxshade 3.21 portálu Expasy.

Jelikož mapa elektronové hustoty 14-3-3L.t. umožňovala vestavět pouze 5 aminokyselinových zbytků peptidu PtdIns4KIIIβ z 10 narozdíl od 8 zbytků peptidu vázaného proteinem 14-3-3ζ, předpokládali jsme, že bude fosfopeptid vázán proteinem 14-3-3 L.t slaběji. To by vysvětlovalo volnější pohyb peptidu a nemožnost spolehlivě

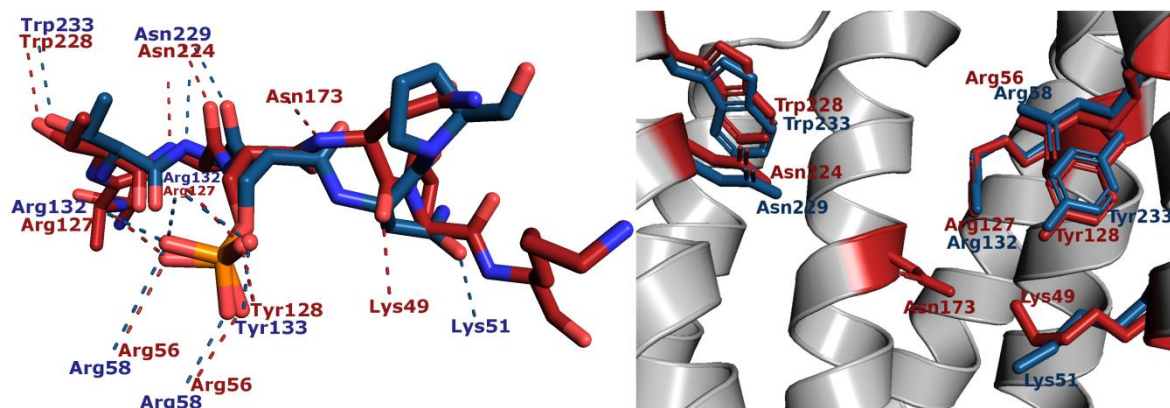


Obr. 6.2: Porovnání struktur 14-3-3 ζ a 14-3-3 L.t. Červeně zobrazen 14-3-3 ζ a modře 14-3-3 L.t.

zasadit další aminokyseliny do mapy elektronové hustoty. Peptid v komplexu s 14-3-3 L.t. sice skutečně má vyšší B faktor, avšak detailnější pohled na strukturu interakce neukazuje žádné zásadní rozdíly v interakci.

Oblasti vazebného žlábků 14-3-3 proteinu, v nichž se nacházejí aminokyseliny interagující s peptidem jsou poměrně konzervované jak na sekvenční, tak strukturní úrovni (viz obr. 6.1 a 6.3B, str. 57). Z obr. 6.3B, str. 57, vyplývá, že pozice i orientace (s výjimkou Lys49 respektive Lys51) těchto aminokyselin jsou shodné. Je tak tedy možná téměř totožná interakce s peptidem. Na vazbě se v obou případech podílejí aminokyseliny Arg 56, Arg127, Tyr128, Lys49, Asn224 a Trp228 (číslováno dle 14-3-3 ζ), v proteinu 14-3-3 ζ interaguje s peptidem i Asn173. Neexistenci této interakce v komplexu 14-3-3 L.t. je možné vysvětlit rozdílnou konformací vázaného peptidu na jeho C-konci, viz obr. 6.3A, str. 57, kdy má peptidová vazba mezi aminokyselinami pSer294 a Asn295 rozdílnou orientaci a determinuje tak jiný směr stáčení peptidu. Nepřítomnost této vazby umožňuje volnější pohyb Asn295 peptidu a vysvětluje vyšší B faktor peptidu vázaného proteinem 14-3-3 L.t. Fosfopeptid také při vazbě na 14-3-3 L.t. zaujímá protáhlejší konformaci, čemuž odpovídá rozdílná orientace Lys51 14-3-3 L.t. v porovnání s Lys49 14-3-3 ζ .

Konzervovanost interakce mezi dvěma druhově vzdálenými zástupci 14-3-3 proteinů s PtdIns4KIII β naznačuje důležitou fyziologickou funkci této vazby napříč eukaryotními organismy.



Obr. 6.3: Vazba fosfopeptidu PtdIns4KIII β 14-3-3 proteiny. A) Konformace vázaného fosfopeptidu. Červeně vyznačen peptid vázaný 14-3-3 ζ a názvy aminokyselin 14-3-3 ζ podílejících se na interakci s peptidem, modře peptid vázaný 14-3-3 L.t a aminokyseliny 14-3-3 L.t. B) Pozice a orientace postranních řetězců aminokyselin 14-3-3 proteinů zajišťujících interakci s peptidem. Červeně znázorněny postranní řetězce aminokyselin 14-3-3 ζ , modře aminokyselin 14-3-3 L.t.

7 ZÁVĚR

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že se nám podařilo naplnit vytyčené cíle bakalářské práce. Byl připraven expresní vektor pro bakteriální expresi 14-3-3ζ. Proteiny 14-3-3ζ a 14-3-3 L.t byly exprimovány, purifikovány do elektroforetické homogenity a byly nalezeny podmínky pro jejich úspěšnou krystalizaci v komplexu s fosfopeptidem PtdIns4KIIIβ. Byla získána difrakční data těchto krystalů, na jejichž základě byly určeny modely struktur 14-3-3ζ a 14-3-3 L.t v komplexu s peptidem z PtdIns4KIIIβ. Strukturní analýza ukázala vysokou konzervovanost této interakce, která naznačuje její evoluční důležitost.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MURRAY, R. K. *Harper's illustrated biochemistry*. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York (2003)
- [2] PETSKO, G., A., RINGE, G. *Protein structure and function*. New Science Press Ltd, Oxford (2004)
- [3] COOPER, G. M. *The cell: a molecular approach*. ASM Press, Washington D.C. (2000)
- [4] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York (2007)
- [5] KORNITZER, D., CIECHANOVER, A.: *J. Cell Physiol.* 182, 1-11 (2000)
- [6] LACKIE, J. *The dictionary of cell and molecular biology*. Academic Press, Waltham (2013)
- [7] GUNNING, P., WEINBERGER, R., JEFFREY, P., HARDEMAN, E.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 339-372 (1998)
- [8] LUISI, P. L.: *Naturwissenschaften* 66, 498-504 (1979)
- [9] VODRÁŽKA, Z., KÁŠ, J., RAUCH, P. *Enzymologie*. VŠCHT, Praha (1998)
- [10] KULKARNI, N.S., DESHPANDE, M.S. *General Enzymology*. Himalaya Pub. House, New Delhi (2007)
- [11] JONES, S., THORNTON, J. M.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 63, 31-65 (1995)
- [12] NOOREN, I. M.A, THORNTON, J.M.: *EMBO J.* 22, 3486-3492 (2003)
- [13] MARIANAYAGAM, N. J., SUNDE, M., MATTHEWS, J.M.: *Trends Biochem. Sci.* 29, 618-625 (2004)
- [14] KOBE, B. a B. E. KEMP.: *Nature* 402, 373-376 (1999)
- [15] SEFTON, B. M.: *Curr Protoc Cell Biol.* 00:14.1, 14.1.1–14.1.3 (2001)
- [16] VAN HEMERT, M. J., STEENSMA, H. Y., VAN HEUSDEN, G. P. H.: *BioEssays* 23, 936-946 (2001)
- [17] ICHIMURA, T., ISOBE, T., OKUYAMA, T., TAKAHASHI, N., ARAKI, K., KUWANO, R., TAKAHASHI, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7084-7088 (1988)
- [18] MARTIN, H., PATEL, Y., JONES, D., HOWELL, S., ROBINSON, K., AITKEN, A.: *FEBS Lett.* 331, 296-303 (1993)
- [19] HOWELL, S.: *J. Biol. Chem.* 270, 5706-5709 (1995)
- [20] AITKEN, Y.: *Semin. Cancer Biol.* 16, 162-172 (2006)

- [21] MOREIRA, J. M. A., SHEN, T., OHLSSON, G., GROMOV, P., GROMOVA, I., CELIS, J. E. A.: *Mol. Cell Proteomics* 7, 1225-1240 (2008)
- [22] TAKAHASHI, Y.: *Neurochem. Res.* 28, 1265-1273 (2003)
- [23] UHART, M., BUSTOS, D. M.: *PLoS ONE* 8, e55703 (2013)
- [24] MUSLIN, A., HEMING, X.: *Cell Signal.* 12, 703-9 (2000)
- [25] ZANNIS-HADJOPOULOS, M., YAHYAOU, W., CALLEJO, M.: *Trends Biochem. Sci.* 33, 44-50 (2008)
- [26] FU, H., SUBRAMANIAN, R., MASTERS, S. C.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 617-647 (2000)
- [27] OBSIL, T., OBSILOVA, V.: *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 663-672 (2011)
- [28] TZIVION, G., AVRUCH, J.: *J. Biol. Chem.* 277, 3061-3064 (2002)
- [29] TZIVION, G., SHEN, Y. H., ZHU, J.: *Oncogene* 20, 6331-6338 (2001)
- [30] MUSLIN, A. J., TANNER, J. W., ALLEN, P. M., SHAW, A. S.: *Cell* 84, 889-897 (1996)
- [31] GARDINO, A. K., SMERDON, S. J., YAFFE, M. B., GARDINO, A. K., SMERDON, S. J.: *Semin. Cancer Biol.* 16, 173-182 (2006)
- [32] JOHNSON, C., CROWTHER, S., STAFFORD, M. J., CAMPBELL, D. G., TOTH, R., MACKINTOSH, C.: *Biochem. J.* 427, 69-78 (2010)
- [33] YAFFE, M. B., RITTINGER, K., VOLINIA, S., CARON, P. R., AITKEN, A., LEFFERS, H., GAMBLIN, S. J., SMERDON, S. J., CANTLEY, L. C.: *Cell* 91, 961-971 (1997)
- [34] YAFFE, M. B.: *FEBS Lett.* 513, 53-57 (2002)
- [35] LIU, D., BIENKOWSKA, J., PETOSA, C., COLLIER, R. J., FU, H., LIDDINGTON, R.: *Nature* 376, 191-194 (1995)
- [36] RITTINGER, K., BUDMAN, J., XU, J., VOLINIA, S., CANTLEY, L. C., SMERDON, S. J., GAMBLIN, S. J., YAFFE M. B.: *Mol. Cell.* 4, 153-66 (1999)
- [37] SILHAN, J., OBSILOVA, V., VECER, J., HERMAN, P., SULC, M., TEISINGER, J., OBSIL, T.: *J. Biol. Chem.* 279, 49113-49119 (2004)
- [38] XIAO, B., SMERDON, S. J., JONES, D. H., DODSON, G. G., SONEJI, Y., AITKEN, A., GAMBLIN, S. J.: *Nature* 376, 188-191 (1995)
- [39] YANG, X., LEE, W. H., SOBOTT, F., PAPAGRIGORIOU, E., ROBINSON, C. V., GROSSMANN, J. G., SUNDSTROM, M., DOYLE, D. A., ELKINS, J. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17237-17242 (2006)

- [40] AITKEN, A.: Semin. Cell Dev. Biol. 22, 673-680 (2011)
- [41] KANAHO, Y., SUZUKI, T.: J. Biochem. 4, 503-509 (2002)
- [42] BALLA, A., BALLA, T.: Trends Cell Biol. 16, 351-361 (2006)
- [43] MINOGUE, S., WAUGH, M. G.: Subcell. Biochem. 58, 1-24 (2012)
- [44] MEYERS, R., CANTLEY, L. C.: J. Biol. Chem. 272, 4384-4390 (1997)
- [45] SRIDHAR, S., PATEL, B., APHKHAZAVA, D., MACIAN, F.,
SANTAMBROGIO, L., SHIELDS, D., CUERVO, A.M.: EMBO J. 32, 324-339
(2013)
- [46] ALTAN-BONNET, N., BALLA, T.: Trends Biochem. Sci. 37, 293-302 (2012)
- [47] GRAHAM, T. R., BURD, CH. G.: Trends Cell Biol. 21, 113-121 (2011)
- [48] GODI, A., PERTILE, P., MEYERS, R., MARRA, P., DI TULLIO, G., IURISCI, C.,
CORDA, D.: Nat. Cell Biol. 1, 280-287 (1999)
- [49] DE GRAAF, P., ZWART, W. T., VAN DIJKEN, R. A. J., DENEKA, M., SCHULZ,
T. K. F., GEIJSEN, N., COFFER, P. J. et al.: Mol. Biol. Cell. 15, 2038-2047 (2004)
- [50] DE GRAAF, P., KLAPISZ, E. E., SCHULZ, T. K., CREMERS, A. F., VERKLEIJ,
A. J., VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M.: J. Cell Sci. 115, 1769-1775
(2002)
- [51] HAUSSER, A.: J. Cell Sci. 119, 3613-3621 (2006)
- [52] BURKE, J. E., INGLIS, A. J., PERISIC, O., MASSON, G. R., MCLAUGHLIN, S.
H., RUTAGANIRA, F., SHOKAT, K. M., WILLIAMS, R. L.: Science 344, 1035-
1038 (2014)
- [53] VALENTE, C., TURACCHIO, G., MARIGGIÒ, S., PAGLIUSO, A., GAIBISSO,
R., DI TULLIO, G., SANTORO, M.: Nat. Cell Biol. 14, 343-354 (2012)
- [54] DEMMEL, L., BECK, M., KLOSE, C., SCHLAITZ, A. L., GLOOR, Y., HSU, P.
P., HAVLIS, J. et al.: Mol. Biol. Cell. 19, 1046-1061 (2008)
- [55] LATTMAN, E., LOLL, P.: *Protein crystallography: a concise guide*. Johns Hopkins
University Press, Baltimore (2008)
- [56] RUPP, B.: *Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to
structural biology*. Garland Science, New York (2010)
- [57] RHODES, G.: *Crystallography made crystal clear: a guide for users of
macromolecular models*. Academic Press, San Diego (2000)
- [58] BLOW, D.: *Outline of crystallography for biologists*. Oxford University Press, New
York (2002)

- [59] HAMMOND, C.: *The basics of crystallography and diffraction*. Oxford University Press, New York (2009)
- [60] CLEGG, W.: *Crystal structure determination*. Oxford University Press, New York (1998)
- [61] QIAGEN, QIAquick® Spin Handbook (2008)
- [62] QIAGEN, QIAprep® Miniprep Handbook (2006)
- [63] KABSCH, W.: Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)
- [64] MCCOY, A. J., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., ADAMS, P. D., WINN, M. D., STORONI, L. C., READ, R. J.: J. Appl. Cryst. 40, 658-674 (2007)
- [65] ADAMS, P. D., P, AFONINE, V., BUNKÓCZI, G., CHEN, V. B., DAVIS, I. W., ECHOLS, N., HEADD, J. J., HUNG, L. W., KAPRAL, G. J., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., MCCOY, A. J., MORIARTY, N. W., OEFFNER, R., READ, R. J., RICHARDSON, D. C., RICHARDSON, J. S., TERWILLIGER, T. C. , ZWART, P. H.: Acta Cryst. D66, 213-221 (2010)
- [66] EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W. G., COWTAN, K.: Acta Cryst. D66, 486-501 (2010)
- [67] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka